

NGHIÊN CỨU NHÂN *IN VITRO* DẠ YẾN THẢO HOA TÍM (*Petunia hybrida* Hort.)

Phạm Thị Huyền Trang¹, Nguyễn Thị Thúy Hạnh², Phùng Thị Thu Hà^{1*}

¹Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: phungthithuha@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 16.08.2023

Ngày chấp nhận đăng: 05.01.2024

TÓM TẮT

Dạ yến thảo hoa tím (*Petunia hybrida* Hort.), thuộc họ Cà (Solanaceae), là cây hoa trồng chậu phổ biến, có giá trị cao, hiện đang được thị trường ưa chuộng. Do đó, nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Dạ yến thảo hoa tím được thực hiện để có thể sản xuất số lượng lớn cây giống sạch bệnh, chất lượng đồng đều, đáp ứng nhu cầu thị trường. Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (RCD) với ba lần nhắc lại. Nghiên cứu đã xác định được môi trường Murashige and Skoog (MS) đặc bổ sung 0,5 mg/l BA là thích hợp nhất để nhân chồi Dạ yến thảo hoa tím, với hệ số nhân chồi đạt 19,78 chồi/mẫu, chiều cao chồi đạt 2,36cm sau 6 tuần nuôi cấy. Môi trường phù hợp nhất để dưỡng chồi là MS đặc bổ sung 40 g/l sucrose, cho chồi mập, xanh, lá to. Kết quả cũng cho thấy môi trường phù hợp cho giai đoạn ra rễ và thích nghi ngoài vườn ươm là MS đặc bổ sung 0,1 g/l than hoạt tính (AC), với tỷ lệ ra rễ đạt 100%, cây ra ngôi có 12,83 rễ/cây, chiều dài rễ đạt 2,28cm, rễ trắng, dài, mập. Sau 2 tuần thích nghi ngoài vườn ươm, cây con có nguồn gốc từ môi trường ra rễ MS đặc bổ sung 0,1 g/l AC có tỷ lệ sống đạt 100% với chiều cao cây đạt 6,47cm, số lá đạt 15,07 lá/cây.

Từ khóa: BA, Dạ yến thảo hoa tím, nuôi cấy mô, than hoạt tính.

Study on *In vitro* Propagation of Purple petunia (*Petunia hybrida* Hort.)

ABSTRACT

Purple petunia (*Petunia hybrida* Hort.), belonging to the Solanaceae family, is a popular and high - value potted ornamental plant on the flower market. Therefore, *in vitro* propagation research of Purple petunia has been carried out in order to produce large numbers of genetically uniform and pathogen-free plantlets to meet market demand. All experiments were arranged in a randomized complete design (RCD) with three replicates. The results showed that Murashige and Skoog (MS) solid medium supplemented with 0.3 mg/l BA was the most suitable medium for shoot regeneration and multiplication of Purple petunia, with a high multiplication rate (19.78 shoots/explant), and a shoot height of 2.36cm after 6 weeks of culture. The most suitable medium for Purple petunia shoot nursing was MS solid medium supplemented with 40 g/l sucrose, producing large and green shoot and leaves. The results also showed that the suitable medium for the rooting stage and acclimatization was MS solid medium supplemented with 0.1 g/l activated charcoal (AC), resulting in the root formation rate of 100%; 12.83 roots/plantlet; 2.28 cm in root length with white, long and big roots. After 2 weeks of acclimatization in the net house, plantlets derived from MS solid rooting medium supplemented with 0.1 g/l AC had a survival rate of 100% with 6.47cm in plant height and 15.07 leaves/plant.

Keywords: Activated charcoal, BA, *Petunia hybrida* Hort., tissue culture.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dạ yến thảo (*Petunia hybrida* Hort.), thuộc họ Cà (Solanaceae), là loài cây thân thảo, cao từ 0,3-1m, với hình thái và màu sắc hoa đa dạng, cây sai hoa, ra hoa quanh năm (Phạm Hoàng

Hộ, 2000). Dạ yến thảo có nguồn gốc từ vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới của Nam Mỹ và được lan rộng sang các nước có khí hậu tương tự. Tại Việt Nam, Dạ yến thảo là một trong những cây hoa trồng chậu phổ biến được trồng để trang trí cảnh quan sân vườn, đường phố.

Hiện nay, Dạ yến thảo thường được trồng từ hạt hoặc giâm cành. Tuy nhiên, theo Bùi Thị Cúc & cs. (2017) hạt Dạ yến thảo có tỷ lệ nảy mầm không cao (60%), hơn nữa cây giâm cành có sức sống yếu và nhanh tàn hơn cây gieo hạt. Ngoài ra, hệ số nhân giống bằng phương pháp giâm cành thấp (Bùi Thị Cúc & cs., 2017). Vì vậy, nguồn cung cây giống Dạ yến thảo hiện chưa đáp ứng được nhu cầu của thị trường. Trong khi đó, phương pháp nhân giống vô tính bằng nuôi cấy mô tế bào thực vật (*in vitro*) cho cây con sạch bệnh, giữ nguyên đặc tính của cây mẹ. Cây con đồng nhất về mặt di truyền nên chất lượng cây giống đồng đều. Ngoài ra, phương pháp nhân giống *in vitro* có hệ số nhân giống cao nên giá thành cây giống thấp hơn các phương pháp nhân giống truyền thống khác.

Các nghiên cứu ứng dụng phương pháp nuôi cấy mô tế bào trên cây Dạ yến thảo được bắt đầu từ những năm 1960 (Izhar & Zelcer, 1984). Mẫu vật liệu sử dụng để tái sinh Dạ yến thảo là đỉnh sinh trưởng, đoạn thân mang mắt ngủ và phiến lá. Natalija & cs. (2015) đã nghiên cứu sự tái sinh chồi từ lá *in vitro* của ba giống Dạ yến thảo (*Petunia hybrida* 'Purple Velvet', 'Ramblin Nu Blue' và 'Touha'). Bùi Thị Cúc & cs. (2017) đã nhân *in vitro* giống Dạ yến thảo hoa hồng sọc tím bằng chồi được tái sinh từ đoạn thân mang mắt ngủ. Nguyễn Tiến Long & cs. (2021) đã tạo được nguồn vật liệu khởi đầu trong vi nhân giống từ mô lá cây *in vitro* của giống Dạ yến thảo tím hồng. Farooq & cs. (2021) đã tối ưu hóa quy trình nhân nhanh từ đỉnh sinh trưởng, đoạn thân mang mắt ngủ và phiến lá *in vitro* của giống Dạ yến thảo *P. hybrida* cv. 'Bravo'. Tuy nhiên, hiện chưa có nghiên cứu nhân *in vitro* giống Dạ yến thảo hoa tím được công bố. Vì vậy, kết quả của nghiên cứu này bước đầu xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cây Dạ yến thảo hoa tím nhằm mục đích sản xuất cây giống với số lượng lớn, chất lượng cao và ổn định để đáp ứng nhu cầu của thị trường.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Cây Dạ yến thảo hoa tím (*Petunia hybrida* Hort.) được thu thập tại Đà Lạt và cung cấp bởi

Bộ môn Thực vật, Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Các môi trường nuôi cấy *in vitro* được điều chỉnh về pH = 5,8 và được hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút, áp suất 1,1atm. Đối với các thí nghiệm *in vitro*, mẫu được nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ phòng 25°C ± 1°C, độ ẩm 70-75%, ánh sáng có cường độ 2.000Lux, chu kỳ chiếu sáng là 10h sáng/14h tối. Thí nghiệm ở giai đoạn vườn ươm được thực hiện dưới ánh sáng tự nhiên, trong nhà lưới có mái che nilon trắng.

2.2.2. Bố trí thí nghiệm

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu một nhân tố, hoàn toàn ngẫu nhiên (RCD), mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 30 mẫu.

Giai đoạn tạo nguồn vật liệu khởi đầu

Đoạn thân Dạ yến thảo hoa tím được khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% trong 10 phút (Nguyễn Tiến Long & cs., 2021) sau đó được rửa bằng nước cất vô trùng 2-3 lần. Thân sau khử trùng được cắt thành các đoạn mang 1 mắt ngủ và được cấy vào môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) có bổ sung 30 g/l sucrose; 6,5 g/l agar; pH 5,8. Chồi non tái sinh được sử dụng làm nguồn vật liệu vô trùng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Giai đoạn nhân chồi

Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của BA đến khả năng nhân chồi Dạ yến thảo hoa tím

Mẫu thí nghiệm là đoạn thân mang 1 mắt ngủ dài 0,5-1cm từ nguồn vật liệu vô trùng. Mẫu được cấy vào môi trường MS + 30 g/l sucrose + 6,5 g/l agar + BA ở các hàm lượng (0; 0,5; 1; 1,5 mg/l). Các chỉ tiêu được theo dõi sau 6 tuần nuôi cấy bao gồm: Thời gian tái sinh chồi (ngày); Hệ số nhân chồi (chồi/mẫu) = Tổng số chồi/Tổng số mẫu cấy; Chiều cao chồi (cm) = Tổng chiều cao chồi/tổng số chồi; Hình thái chồi (màu sắc, kích thước (mập, mảnh), có hiện tượng thủy tinh hóa).

Giai đoạn dưỡng chồi

Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của hàm lượng dinh dưỡng khoáng đến chất lượng chồi Dạ yến thảo hoa tím

Mẫu cấy thí nghiệm là đoạn thân mang một mắt ngủ từ nguồn vật liệu vô trùng. Mẫu được cấy vào bốn nền môi trường gồm: MS, 1/2 MS (giảm còn 1/2 đa lượng so với MS), 1/4 MS (giảm còn 1/4 đa lượng so với MS), MS/2 (giảm cả đa lượng và vi lượng còn 1/2 so với MS). Các môi trường đều được bổ sung 30 g/l sucrose và 6,5 g/l agar.

Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của sucrose đến chất lượng chồi Dạ yến thảo hoa tím

Mẫu được cấy vào nền môi trường tốt nhất thu được ở thí nghiệm 2, bổ sung thêm sucrose với các hàm lượng khác nhau (10, 20, 30, 40 g/l).

Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của nước dừa đến chất lượng chồi Dạ yến thảo hoa tím

Mẫu được cấy vào môi trường tốt nhất thu được ở thí nghiệm 3 bổ sung thêm nước dừa với các nồng độ khác nhau (0%, 5%, 10%, 15%).

Các chỉ tiêu của các thí nghiệm ở giai đoạn dưỡng chồi được theo dõi sau 4 tuần nuôi cấy bao gồm: Chiều cao chồi (cm) = Tổng chiều cao chồi/tổng số chồi; Hình thái chồi (màu sắc, kích thước (mập, mảnh), có hiện tượng thủy tinh hóa.

Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Đoạn chồi *in vitro* dài 2cm được cấy vào môi trường tạo cây hoàn chỉnh ở các công thức thí nghiệm khác nhau.

Thí nghiệm 5: Ảnh hưởng của NAA, AC đến khả năng ra rễ của Dạ yến thảo hoa tím

Chồi được cấy vào môi trường MS + 30 g/l sucrose + 6,5 g/l agar + NAA ở các hàm lượng (0; 0,1; 0,3; 0,5 mg/l) hoặc than hoạt tính (AC) ở các hàm lượng (0,1; 0,3 g/l). Các chỉ tiêu được theo dõi sau 10 ngày nuôi cấy gồm: Tỷ lệ cây ra rễ (%) = (Số cây ra rễ/Tổng số cây) × 100%; Số rễ trên cây (rễ/cây) = Tổng số rễ/Tổng số cây ra rễ; Chiều dài rễ (cm) = Tổng chiều dài các rễ/Tổng số rễ; Hình thái rễ: màu sắc, kích thước (mập, mảnh).

Giai đoạn vườn ươm

Thí nghiệm 6: Ảnh hưởng của môi trường ra rễ có NAA, AC đến khả năng sinh trưởng của cây con Dạ yến thảo hoa tím giai đoạn vườn ươm

Mẫu cây đã hình thành rễ trong 10 ngày ở các công thức thí nghiệm 5 được trồng trên các khay nhựa 104 lỗ (kích thước Dài 56cm × Rộng 36cm × Cao 4cm) với cùng 1 loại giá thể (đất phù sa: Peatmoss, tỷ lệ 1:1 theo thể tích). Giá thể Peatmoss được nhập khẩu từ công ty Nord Agri (Latvia) có thành phần gồm: rêu bùn, địa y, mùn gỗ, đất mùn, phân NPK 14-16-18 (1,2 kg/m³), đá trân châu, nguyên tố vi lượng, đất sét, chất làm ướt, với pH 5,5-6,5. Cây con được trồng trong nhà lưới có mái che nilon trắng và được phun sương ẩm bề mặt 3 lần/ngày.

Các chỉ tiêu được theo dõi sau 2 tuần ra ngôi, bao gồm: Tỷ lệ cây sống (%) = (Số lượng cây sống/Tổng số cây ra ngôi) × 100%; Chiều cao cây (cm) = Tổng chiều cao cây/Tổng số cây; Số lá trên cây (lá/cây) = Tổng số lá trên các cây/Tổng số cây.

2.2.3. Xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được xử lý theo phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) bằng phần mềm thống kê IRRISTAT 5.0 và Duncan's Test.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 01 đến tháng 12 năm 2022 tại Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ - Gia Lâm - Hà Nội.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của BA đến khả năng nhân chồi Dạ yến thảo hoa tím

Mục tiêu của giai đoạn nhân chồi là làm tăng số lượng chồi để nhân nhanh giống. Môi trường nuôi cấy ở giai đoạn này thường được bổ sung các chất điều tiết sinh trưởng và các chất bổ sung để tăng hệ số nhân mà vẫn đảm bảo được chất lượng chồi. Theo Sakakibara (2006), trong các chất điều tiết sinh trưởng thì cytokinin có vai trò quan trọng trong việc phân chia tế bào và kích thích sự hình thành chồi. Do đó, BA, một chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin, được bổ sung vào môi trường nuôi cấy *in vitro* để tăng hệ số nhân giống của Dạ yến thảo hoa tím.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA đến khả năng nhân chồi Dạ yến thảo hoa tím (sau 6 tuần nuôi cấy)

Hàm lượng BA (mg/l)	Thời gian tái sinh chồi (ngày)	Hệ số nhân (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm)	Tỷ lệ bật chồi (%)	Đặc điểm hình thái chồi
0,0	5,22 ^c	1,00 ^d	6,35 ^a	100,00	Không hình thành cụm chồi, các chồi đơn dài, mảnh, màu xanh
0,5	9,33 ^b	19,78 ^b	2,36 ^b	100,00	Chồi ngắn, mập, xanh, ngoài ra có các chồi nhỏ trong cụm
1,0	11,56 ^a	26,67 ^a	1,46 ^c	85,56	Chồi ngắn, mảnh, xanh nhạt, một số chồi bị thủy tinh hóa, ngoài ra còn nhiều chồi nhỏ li ti
1,5	11,44 ^a	13,22 ^c	1,38 ^c	70,00	Chồi ngắn, mảnh, xanh nhạt, nhiều chồi bị thủy tinh hóa, nhiều chồi nhỏ li ti
LSD _{0,05}	1,27	0,89	0,15		
CV%	6,8	2,9	2,7		

Ghi chú: Trên cùng một cột, các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% trong phép thử Duncan.

Bảng 2. Ảnh hưởng của hàm lượng dinh dưỡng khoáng đến chất lượng chồi Dạ yến thảo hoa tím (sau 4 tuần nuôi cấy)

Hàm lượng dinh dưỡng khoáng	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái chồi
MS	4,81 ^b	Chồi mập, xanh
1/2 MS	5,98 ^a	Chồi dài, mảnh, xanh
1/4 MS	2,21 ^c	Chồi ngắn, mảnh, xanh nhạt, lá vàng
MS/2	5,74 ^a	Chồi dài, mảnh, xanh
LSD _{0,05}	0,34	
CV%	3,60	

Ghi chú: Trên cùng một cột, các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% trong phép thử Duncan.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy khi tăng hàm lượng BA từ 0-1,5 mg/l thì thời gian tái sinh chồi cũng kéo dài, đồng thời chiều cao chồi và tỷ lệ bật chồi lại giảm. Hệ số nhân chồi tăng khi hàm lượng BA tăng từ 0 đến 1 mg/l. Tuy nhiên khi hàm lượng BA tăng lên 1,5 mg/l thì hệ số nhân chồi và chất lượng chồi lại giảm, chồi mảnh, thấp, nhiều chồi nhỏ li ti, có hiện tượng thủy tinh hóa, một số chồi biến dạng. Do ở môi trường có hàm lượng BA cao đã kích thích tăng sinh tế bào nhanh dẫn tới ức chế quá trình biệt hóa của mô sẹo thành chồi hoàn chỉnh, làm ảnh hưởng tới chất lượng chồi và hệ số tái sinh chồi. Kết quả này tương tự với nghiên cứu bổ sung BA vào môi trường nuôi cấy để tái sinh đoạn thân *in vitro* giống Dạ yến thảo tím hồng của

Nguyễn Tiến Long & cs. (2021) và Dạ yến thảo hoa hồng sọc tím của Bùi Thị Cúc & cs. (2017).

Bảng 1 cũng chỉ ra rằng, hệ số nhân chồi ở tất cả các công thức bổ sung BA cao hơn và sai khác có ý nghĩa thống kê so với công thức không bổ sung BA, như vậy có thể thấy rằng BA có ảnh hưởng tích cực tới quá trình phản biệt hóa và tái sinh chồi của Dạ yến thảo hoa tím. Theo Sara & Naglaa (2015) thì trong môi trường có bổ sung BA, mẫu cấy đột thân Dạ yến thảo sẽ tạo mô sẹo trước sau đó sẽ tái sinh chồi, kết quả tương tự cũng được ghi nhận trong thí nghiệm ở bảng 1. Mặc dù, ở môi trường bổ sung 1 mg/l BA chồi được nhân với hệ số cao nhất (26,67 chồi/mẫu) nhưng chất lượng chồi kém, chồi mảnh, xanh nhạt, một số chồi bị thủy tinh hóa và xuất hiện

nhiều chồi nhỏ li ti. Vì vậy, hàm lượng thích hợp của BA bổ sung vào môi trường nhân chồi trong nuôi cấy mô Dạ yến thảo hoa tím là 0,5 mg/l, với hệ số nhân chồi đạt 19,78 chồi/mẫu, chiều cao chồi đạt 2,36cm, chồi mập, xanh. Theo Nguyễn Tiến Long & cs. (2021) BA có vai trò quyết định đến khả năng tái sinh và sinh trưởng của chồi *in vitro*. Tuy nhiên, với giống Dạ yến thảo tím hồng có nguồn gốc Thái Lan thì môi trường bổ sung 1 mg/l BA + 0,2 mg/l IBA là tốt nhất để tái sinh chồi với chồi/mẫu đạt 19,53 và chiều cao trung bình/chồi đạt 2,80cm (Nguyễn Tiến Long & cs., 2021). Ngoài ra, theo Bùi Thị Cúc & cs. (2017) thì cây Dạ yến thảo hoa hồng sọc tím cho đường kính cụm chồi đạt cao nhất 1,84cm với chiều cao chồi 0,81cm ở môi trường có bổ sung 1 mg/l BA. Như vậy, tùy thuộc vào từng giống Dạ yến thảo mà có sự cảm ứng khác nhau với BA trong môi trường nuôi cấy. Với giống Dạ yến thảo hoa tím thì hàm lượng BA thích hợp nhất trong môi trường nhân chồi là 0,5 mg/l

3.2. Ảnh hưởng của hàm lượng dinh dưỡng khoáng đến chất lượng chồi Dạ yến thảo hoa tím

Chất lượng chồi là một yếu tố quan trọng trong quá trình nhân nhanh. Ở giai đoạn nhân chồi, Dạ yến thảo hoa tím có hệ số nhân chồi cao đạt 13-26 chồi/mẫu (Bảng 1) nên chồi thường nhỏ, mảnh, yếu. Do đó, chồi cần được trải giai đoạn dưỡng để làm tăng chất lượng, giúp quá trình tạo cây hoàn chỉnh được thuận lợi. Nhờ vậy cây con ở giai đoạn ra ngôi sẽ có tỷ lệ sống cao và đáp ứng được yêu cầu về chất lượng. Trong giai đoạn này, môi trường nuôi cấy không bổ sung thêm chất kích thích sinh trưởng để hạn chế việc nhân thêm chồi từ các chồi đã tái sinh.

Nền môi trường là nguồn dinh dưỡng cơ bản để chồi phát triển. Khi không sử dụng các chất điều tiết sinh trưởng thì thành phần nền môi trường đóng vai trò quan trọng vào quá trình dưỡng chồi. Chất lượng chồi phụ thuộc nhiều vào thành phần của các nhân tố trong môi trường nuôi cấy như khoáng đa lượng, vi lượng, vitamin, nguồn carbon. Vì vậy, thí nghiệm được tiến hành để xác định nền môi trường dưỡng chồi phù hợp nhất đối với giống Dạ yến thảo hoa tím.

Kết quả ở bảng 2 chỉ ra rằng hàm lượng dinh dưỡng khoáng 1/2 MS và MS/2 đều cho chồi có chiều cao lớn nhất, nhưng chồi dài, mảnh, xanh. Ngược lại, môi trường với hàm lượng dinh dưỡng khoáng 1/4 MS cho chiều cao chồi thấp nhất (2,21cm), chồi ngắn, mảnh, xanh nhạt, lá vàng. Do trong môi trường với hàm lượng dinh dưỡng khoáng 1/4 MS chồi bị thiếu khoáng đa lượng nên sự sinh trưởng bị chậm dẫn đến chất lượng chồi kém. Trong 4 hàm lượng dinh dưỡng khoáng nghiên cứu thì hàm lượng dinh dưỡng khoáng MS cho kích thước chồi chỉ cao thứ 3 (4,81cm) và sai khác có ý nghĩa thống kê với các hàm lượng dinh dưỡng khoáng còn lại, nhưng chất lượng chồi tốt (mập, xanh), phù hợp để chuẩn bị cho giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh. Như vậy việc giảm hàm lượng dinh dưỡng khoáng và vitamin trong nền môi trường dưỡng chồi Dạ yến thảo hoa tím đều làm ảnh hưởng không tốt đến chất lượng chồi. Nên môi trường với hàm lượng dinh dưỡng khoáng MS là thích hợp để dưỡng chồi Dạ yến thảo hoa tím. Kết quả nghiên cứu của Farooq & cs. (2021) cho thấy quy trình nhân nhanh tối ưu của giống Dạ yến thảo 'Bravo' cũng sử dụng nền môi trường MS.

3.3. Ảnh hưởng của sucrose đến chất lượng chồi Dạ yến thảo hoa tím

Đường sucrose là nguồn cung cấp carbon quan trọng trong quá trình nuôi cấy mô thực vật để tế bào duy trì quá trình tổng hợp các chất hữu cơ, đảm bảo sự phát triển tối ưu (Muller & cs., 2011; Gago & cs., 2014). Sucrose cũng hỗ trợ duy trì khả năng thẩm thấu và giữ nước trong tế bào (Gago & cs., 2014). Vì vậy, việc xác định hàm lượng sucrose phù hợp trong môi trường nuôi cấy là rất quan trọng.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy khi hàm lượng sucrose tăng từ 10-40 g/l thì chất lượng chồi cũng tăng. Ở môi trường 10-20 g/l sucrose, chồi mập, bị thủy tinh hóa do thiếu đường để cung cấp cho quá trình tăng sinh khối của chồi. Bảng 3 cũng chỉ ra rằng, ở môi trường bổ sung 30 g/l sucrose cho chiều cao chồi lớn nhất (đạt 4,79cm), nhưng môi trường bổ sung 40 g/l sucrose cho

chất lượng chồi tốt nhất. Vì vậy, môi trường thích hợp nhất để dưỡng chồi Dạ yến thảo hoa tím là MS đặc có bổ sung 40 g/l sucrose, với chồi đạt chiều cao 4,44cm, chồi mập, xanh, lá to. Kết quả này khác với các nghiên cứu nhân nhanh hai giống Dạ yến thảo hồng tím và 'Bravo'. Hai giống Dạ yến thảo này sinh trưởng tối ưu ở môi trường nuôi cấy bổ sung 30 g/l sucrose (Bùi Thị Cúc & cs., 2017; Farooq & cs., 2021). Như vậy, chồi của các giống Dạ yến thảo khác nhau có nhu cầu sử dụng đường khác nhau trong quá trình nuôi cấy.

3.4. Ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng nhân chồi Dạ yến thảo hoa tím

Nước dừa được sử dụng rộng rãi trong nuôi cấy mô thực vật nhờ đặc tính điều hòa sinh trưởng và hoạt tính cytokin (Yong & cs., 2009). Do trong nước dừa ngoài đường, vitamin, khoáng chất, auxin và axit amin thì còn chứa chứa hàm lượng cao các glucoside của cytokinin (Aguilar & cs., 2009; Yong & cs., 2009). Cytokinin trong nước dừa thúc đẩy quá trình phân chia tế bào, kích thích quá trình nhân nhanh tế bào và mô (Yong & cs., 2009). Vì vậy, thí nghiệm này được tiến hành để đánh giá tác động của nước dừa lên chất lượng chồi Dạ yến thảo hoa tím trong giai đoạn dưỡng chồi.

Bảng 4 cho thấy môi trường MS không bổ sung nước dừa cho chồi có chiều cao lớn nhất đạt 4,74cm và chất lượng tốt nhất với hình thái chồi

mập, xanh, lá to. Khi tăng hàm lượng nước dừa lên 5-15% thì chồi mảnh hơn, bị vàng và có hiện tượng tạo callus ở gốc. Đặc biệt ở môi trường bổ sung 15% nước dừa tạo nhiều callus ở gốc. Từ thí nghiệm này cho thấy nước dừa không có tác dụng dưỡng chồi Dạ yến thảo hoa tím. Nghiên cứu của Borkird & Sink (1983) cũng cho kết quả tương tự, nước dừa không có tác dụng thúc đẩy sự tăng trưởng chồi ngọn trong nuôi cấy mô chủng đại loài Dạ yến thảo *Petunia inflata*.

3.5. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Sau giai đoạn dưỡng chồi các chồi Dạ yến thảo có chất lượng tốt được chuyển sang môi trường ra rễ nhằm tạo cây hoàn chỉnh để chuẩn bị cho bước huấn luyện cây con ngoài vườn ươm. Giai đoạn này các chất có tác dụng kích thích tạo chồi và vươn cao chồi được loại bỏ, thay vào đó là các chất có tác dụng kích thích ra rễ. Do vậy, các nhóm chất auxin thường được sử dụng vào môi trường nuôi cấy sau giai đoạn nhân nhanh. Ngoài ra, than hoạt tính cũng thường được bổ sung vào môi trường ra rễ do than hoạt tính có tác dụng kích thích ra rễ và hấp thu các chất ức chế trong môi trường như các chất chuyển hóa độc hại, phenol và dịch tiết màu nâu (Thomas & cs., 2008). Vai trò tích cực của than hoạt tính đã được chứng minh trong nhiều nghiên cứu trên các đối tượng khác nhau. Than hoạt tính cũng có tác dụng kích thích ra rễ trên Dạ yến thảo hoa tím nuôi cấy mô (Bảng 5).

Bảng 3. Ảnh hưởng của sucrose đến chất lượng chồi Dạ yến thảo hoa tím (sau 4 tuần nuôi cấy)

Hàm lượng sucrose (g/l)	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái chồi
10	3,94 ^c	Chồi mảnh, nhiều chồi thủy tinh hóa
20	3,58 ^d	Chồi mảnh, một số chồi thủy tinh hóa
30	4,79 ^a	Chồi mập, xanh, lá nhỏ
40	4,44 ^b	Chồi mập, xanh, lá to
LSD _{0,05}	0,22	
CV%	2,70	

Ghi chú: Trên cùng một cột các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% trong phép thử Duncan.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nước dừa đến chất lượng chồi Dạ yến thảo hoa tím (sau 4 tuần nuôi cấy)

Hàm lượng nước dừa (%)	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái chồi	Ghi chú
0	4,74 ^a	Chồi mập, xanh, lá to	-
5	4,56 ^a	Chồi mập, xanh	-
10	3,52 ^c	Chồi mảnh, vàng nhạt	Có hiện tượng tạo callus
15	3,91 ^b	Chồi mảnh, vàng	Tạo nhiều callus
LSD _{0,05}	0,34		
CV%	4,10		

Ghi chú: Trên cùng một cột, các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% trong phép thử Duncan.

Bảng 5. Ảnh hưởng của NAA, AC đến sự ra rễ của Dạ yến thảo hoa tím (sau 10 ngày nuôi cấy)

Môi trường ra rễ	Tỷ lệ cây ra rễ (%)	Số rễ trên cây (rễ/cây)	Chiều dài rễ (cm)	Đặc điểm hình thái rễ
MS	100	3,39 ^c	2,95 ^a	Rễ trắng, dài, mảnh
MS + 0,1 mg/l NAA	100	32,33 ^a	0,32 ^c	Rễ trắng, rễ ngắn, mập
MS + 0,3 mg/l NAA	0	0,00 ^e	0,00 ^d	-
MS + 0,5 mg/l NAA	0	0,00 ^e	0,00 ^d	-
MS + 0,1 g/l AC	100	12,83 ^b	2,28 ^b	Rễ trắng, dài, mập
MS + 0,3 g/l AC	55,56	2,22 ^d	0,27 ^c	Rễ trắng, ngắn, mập
LSD _{0,05}		0,46	0,10	
CV%		3,00	5,40	

Ghi chú: Trên cùng một cột, các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% trong phép thử Duncan.

3.5.1. Ảnh hưởng của NAA, AC đến sự ra rễ của Dạ yến thảo hoa tím

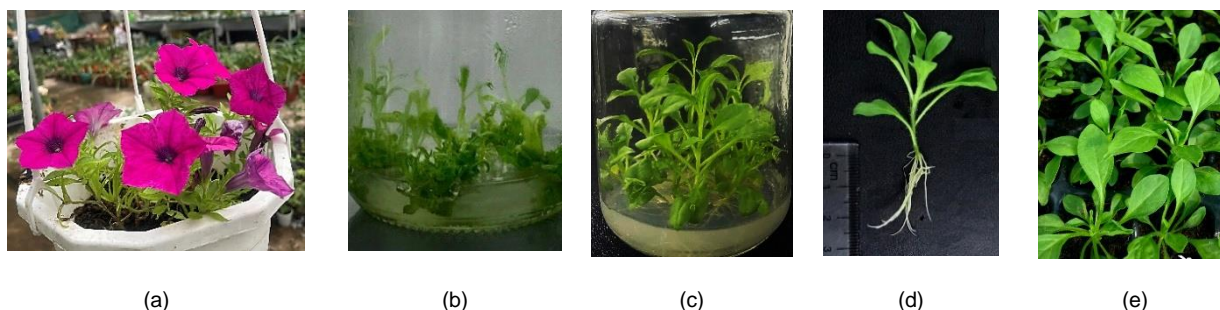
Số liệu ở bảng 5 cho thấy, trong môi trường không bổ sung NAA hay AC, 100% chồi Dạ yến thảo vẫn tạo rễ nhưng rễ dài, mảnh, số lượng ít. Khi bổ sung 0,1 mg/l NAA số rễ tăng mạnh (đạt 32,33 rễ/cây), rễ ngắn và mập. Tuy nhiên, khi tăng hàm lượng NAA lên 0,2-0,3 mg/l thì chồi Dạ yến thảo bị ức chế không ra rễ. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Bùi Thị Cúc & cs. (2017) trên cây Dạ yến thảo hoa hồng sọc tím. Nghiên cứu chỉ ra rằng khi bổ sung 0,1 mg/l NAA vào môi trường nuôi cấy thì tỉ lệ ra rễ đạt 100%, số rễ đạt 51,87. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ NAA lên 0,2-0,3 mg/l thì tỷ lệ ra rễ và số rễ trung bình giảm (Bùi Thị Cúc & cs.,

2017). Bảng 5 cũng cho thấy, số lượng, chiều dài rễ và tỷ lệ ra rễ tăng khi bổ sung 0,1 g/l AC vào môi trường nuôi cấy. Tuy nhiên, khi tăng hàm lượng AC lên 0,3 g/l thì số lượng rễ, tỷ lệ ra rễ và chiều dài rễ giảm mạnh. Như vậy, hàm lượng AC cao ức chế khả năng ra rễ và chiều dài rễ. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu nuôi cấy mô từ hạt phấn Dạ yến thảo. Nghiên cứu chỉ ra rằng AC ở hàm lượng cao ngoài hấp thụ các chất độc hại còn hấp thụ cả các chất kích thích tăng trưởng từ môi trường nuôi cấy (Belinda, 1980). Như vậy, kết quả ở bảng 5 cho thấy môi trường thích hợp cho Dạ yến thảo hoa tím ở giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh là MS đặc có bổ sung 0,1 g/l AC với tỷ lệ ra rễ đạt 100%; số rễ đạt 12,83 rễ/cây; chiều dài rễ đạt 2,28cm; rễ trắng, dài, mập.

Bảng 6. Ảnh hưởng của các môi trường ra rễ đến một số đặc điểm sinh trưởng của cây giống Dạ yến thảo hoa tím ở vườn ươm (sau 2 tuần ra ngôi)

Môi trường ra rễ	Chỉ tiêu theo dõi	Tỉ lệ cây sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá/cây)
MS		100	5,07 ^b	13,80 ^b
MS+ 0,1 mg/l NAA		100	3,81 ^d	10,60 ^d
MS+ 0,1 g/l AC		100	6,47 ^a	15,07 ^a
MS+ 0,3 g/l AC		100	4,29 ^c	12,47 ^c
LSD _{0,05}			0,28	0,68
CV%			2,60	2,60

Ghi chú: Trên cùng một cột, các chữ cái khác nhau biểu thị sự sai khác có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% trong phép thử Duncan.



Ghi chú: (a): Hình thái Dạ yến thảo hoa tím, (b): Chồi Dạ yến thảo hoa tím ở giai đoạn nhân chồi, (c): Chồi ở giai đoạn dưỡng chồi, (d): Cây nuôi cấy mô ở giai đoạn ra rễ, (e): Cây con sau 2 tuần ra ngôi ở giai đoạn vườn ươm.

Hình 1. Hình thái hoa và các giai đoạn nhân *in vitro* cây Dạ yến thảo hoa tím

3.5.2. Ảnh hưởng của các môi trường ra rễ đến khả năng sinh trưởng của cây con Dạ yến thảo hoa tím ở giai đoạn vườn ươm

Giai đoạn huấn luyện cây con ngoài vườn ươm là giai đoạn cuối cùng và quan trọng nhất trong toàn bộ quá trình vi nhân giống. Trong giai đoạn này, chất lượng của cây giống *in vitro* quyết định đến khả năng sống sót, thích nghi của cây con trong điều kiện *ex vitro*.

Bảng 6 cho thấy cây có nguồn gốc từ môi trường ra rễ có bổ sung AC cho chất lượng cây tốt hơn so với cây ở môi trường bổ sung NAA thể hiện ở các chỉ tiêu sinh trưởng như chiều cao cây, số lá đều cao hơn. Và cây con *in vitro* từ môi trường MS đặc bổ sung 0,1 g/l AC là phù hợp nhất để ra ngôi Dạ yến thảo hoa tím, sau 2 tuần ra ngôi, tỉ lệ cây sống đạt 100%, chiều cao cây trung bình đạt 6,47cm với 15,07 lá/cây.

Kết hợp bảng 5 và 6 cho thấy môi trường tạo cây hoàn chỉnh để ra ngôi Dạ yến thảo hoa tím phù hợp nhất là môi trường MS đặc có bổ sung 0,1 g/l AC

4. KẾT LUẬN

Quy trình nhân giống vô tính bằng phương pháp nuôi cấy mô phù hợp cho Dạ yến thảo hoa tím như sau: đoạn thân Dạ yến thảo hoa tím sau khi khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ được cắt thành đoạn thân mang 1 mắt ngủ, cấy vào môi trường MS đặc bổ sung 30 g/l sucrose, 6,5 g/l agar, pH 5,8 để tái sinh chồi. Chồi non tái sinh được cắt thành đoạn thân mang 1 mắt ngủ dài 0,5-1cm nuôi cấy trong môi trường nhân nhanh MS đặc bổ sung 0,5 mg/l BA cho hệ số nhân chồi đạt 19,78 chồi/mẫu, chiều cao chồi 2,36cm. Tiếp theo, chồi được chuyển sang môi

trường dưỡng chồi là MS đặc bổ sung 40 g/l sucrose để làm tăng chất lượng chồi. Cuối cùng, chồi Dạ yến thảo hoa tím được chuyển sang môi trường ra rễ MS đặc bổ sung 0,1 g/l AC với tỷ lệ ra rễ 100%, đạt 12,83 rễ trên cây, rễ dài 2,28cm. Sau 2 tuần thích nghi ngoài vườn ươm, cây có nguồn gốc từ môi trường ra rễ MS đặc bổ sung 0,1 g/l AC có tỷ lệ sống đạt 100%, với chiều cao 6,47cm và đạt 15,07 lá/cây.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aguilar M.L., Espadas F., Maust B. & Sáenz L. (2009). Endogenous cytokinin content in coconut palms affected by lethal yellowing. *Journal of Plant Pathology*. 91(1): 141-146.
- Belinda M., Maureen R.H. & Frederick M.A. (1980). Effect of charcoal and hormones on anther culture 1980 of *Petunia* and *Nicotiana*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. 102(2): 109-116.
- Borkird C. & Sink K.C. (1983). Medium components for shoot cultures of chlorophyll-deficient mutants of *Petunia inflata*. *Plant Cell Reports*. 2: 1-4.
- Bùi Thị Cúc, Đồng Huy Giới & Bùi Thị Thu Hương (2017). Nhân nhanh *in vitro* cây Dạ yến thảo hoa hồng sọc tím (*Petunia hybrida* L.). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*. 10: 3-10.
- Farooq I., Qadri Z.A., Rather Z.A., Nazki I.T., Bandy N., Rafiq S., Masoodi K.Z., Noureldeen A. & Mansoor S. (2021). Optimization of an improved, efficient and rapid *in vitro* micropropagation protocol for *Petunia hybrida* Vilm. cv. "Bravo". *Saudi Journal of Biological Sciences*. 28: 3701-3709.
- Izhar S. & Zelcer A. (1984). Cell, tissue, and organ culture in *Petunia*. In: Sink, K.C. (eds) *Petunia. Monographs on Theoretical and Applied Genetics*. Vol 9. Springer, Berlin, Heidelberg. doi.org/10.1007/978-3-662-02387-7_9.
- Gago J., Martinez-Nunez L., Landin M., Flexas J. & Gallego P.P. (2014). Modeling the effects of light and sucrose on *in vitro* propagated plants: a multiscale system analysis using artificial intelligence technology. *PLoS One*. 9 (1): 1-11.
- Muller B., Pantin F., Ge'nard M., Turc O., Freixes S., Piques M. & Gibon Y. (2011). Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *J Exp Bot*. 62: 1715-1729.
- Murashige T. & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*. 15: 473-497.
- Natalija B., AuSra B. & Vaida J. (2015). *In vitro* regeneration from leaf explants of *Petunia hybrida* L. *Propagation of Ornamental plants*. 15(2): 47-52.
- Nguyễn Tiến Long, Lã Thị Thu Hằng, Trần Thị Triều Hà, Dương Thanh Thủy & Lê Như Cương (2021). Nghiên cứu tạo nguồn vật liệu khởi đầu trong nhân giống *in vitro* cây hoa Dạ yến thảo (*Petunia hybrida* L.). *Khoa học Nông nghiệp*. 63(7): 53-56.
- Phạm Hoàng Hộ (2000). *Cây cỏ Việt Nam (Tập 2)*. Nhà xuất bản Trẻ. tr. 769.
- Sakakibara H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol*. 57: 431-449.
- Sara E.G. & Naglaa M.E. (2015). *In vitro* preliminary study on *Petunia hybrida* breeding under sodium chloride stress conditions. *Middle East Journal of Agriculture Research*. 4(4): 867-872.
- Thomas & Dennis T. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture", *Biotechnol. Adva*. 26: 618-631.
- Yong J.W.H., Ge L., Yan F. Ng & Tan S.N. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*. 14: 5144-5164.