

THIẾT LẬP QUI TRÌNH VI NHÂN GIỐNG HIỆU QUẢ CÂY DẠ YẾN THẢO (*PETUNIA HYBRIDA* HORT. EX VILMOR.)

ESTABLISH AN EFFICIENT PROTOCOL FOR MICROPROPAGATION OF *PETUNIA HYBRIDA* HORT. EX VILMOR.

Võ Thanh Phúc^{1,2*}, Nguyễn Hoàng Huỳnh^{1,2}, Võ Thanh Truyền³

¹Trường Đại học Bách khoa Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Bến Tre, Việt Nam

*Tác giả liên hệ / Corresponding author: vothanhphuc@hcmut.edu.vn

(Nhận bài / Received: 22/7/2023; Sửa bài / Revised: 03/9/2023; Chấp nhận đăng / Accepted: 08/9/2023)

Tóm tắt - Dạ Yến Thảo là một loài cây cảnh rất được ưa chuộng trong trang trí nhà cửa, sân vườn. Nghiên cứu này được thực hiện để thiết lập một quy trình vi nhân giống hiệu quả cho cây Dạ Yến Thảo. Để hoa Dạ Yến Thảo được khử trùng bằng ethanol 70% trong 1 phút và Javel Mỹ Hào 25% trong 15 phút. Mẫu tái sinh chồi trên môi trường MS bổ sung sucrose 30 g/L, BA 2,5 mg/L, NAA 0,1 mg/L. Meta-topolin 1 mg/L giúp nhân nhanh chồi hiệu quả, đạt 13,7 chồi/ cụm sau 2 tuần nuôi cấy. Ở giai đoạn tạo rễ, môi trường phù hợp là môi trường MS bổ sung sucrose 30 g/L, NAA 1 mg/L và than hoạt tính 0,5 g/L, tỷ lệ tạo rễ đạt 100%, 13,7 rễ/ cây. Cây con đã ra rễ được chuyển sang chậu trồng có chứa mụn xơ dừa và phân bò (tỉ lệ 1:1) đạt tỉ lệ sống cao (80%).

Từ khóa - BA; meta – topolin; NAA; *Petunia hybrida* Hort. ex Vilmor; vi nhân giống

1. Đặt vấn đề

Dạ Yến Thảo (*Petunia hybrida* Hort. ex Vilmor.) là cây bản địa của các nước có khí hậu nhiệt đới hoặc cận nhiệt đới ở khu vực Nam Mỹ [1]. Cây có thân cỏ mềm, dễ trồng, nở nhiều hoa và rất phong phú về màu sắc, dùng để trang trí trong nhà, công viên, vườn hoa,... Cây thường được trồng bằng hạt giống hoặc giâm cành. Tuy nhiên, tỉ lệ nảy mầm của hạt khá thấp, còn phương pháp giâm cành cần lượng cây mẹ lớn, cây con có sức sống yếu [2]. Nhiều nghiên cứu trong nước đã tiến hành vi nhân giống Dạ Yến Thảo. Phương pháp nhân giống thông qua nuôi cấy chồi nách cho kết quả tốt. Tuy nhiên, thời gian nhân chồi thường kéo dài khoảng 5 - 6 tuần [2, 3, 4]. Bên cạnh đó, tỉ lệ sống của cây khi đưa ra vườn ươm ở một số nghiên cứu còn thấp, chỉ đạt 45% [4].

Trong vi nhân giống, việc tìm được loại và nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng thực vật phù hợp cho từng giai đoạn là vô cùng quan trọng. Cytokinin đóng vai trò chủ yếu trong việc tái sinh và nhân nhanh chồi [5]. Meta-topolin (mT) là một cytokinin thơm có hoạt tính cao được phân lập từ lá cây dương. Hợp chất này hoạt động mạnh hơn zeatin và benzyladenine (BA) trong việc thúc đẩy sự hình thành chồi trong nuôi cấy mô thực vật [6]. Bên cạnh đó, mT còn được nhận thấy, có nhiều ưu thế so với các

Abstract - *Petunia hybrida* Hort. ex Vilmor is a popular ornamental plant commonly used for home and garden decoration. This study aimed to develop an effective micropropagation protocol for this plant. Receptacle tissues were disinfected with 70% ethanol for 1 minute, followed by 25% detergent (Javel My Hao, Vietnam) for 15 minutes. Shoots regenerated on MS medium with 30 g/L sucrose, 2.5 mg/L BA, 0.1 mg/L NAA. 1 mg/L meta-topolin was effective for shoot multiplication, resulting in 13.7 shoots per cluster after 2 weeks of culture. For rooting, the best culture medium was MS medium containing 30 g/L sucrose, 1 mg/L NAA, and 0.5 g/L activated carbon, with a root formation rate of 100%, 13.7 roots per explant. Rooted plants were then transferred to pots with a 1:1 ratio of coco peat and cow manure for a maximum survival rate of 80%.

Key words - BA; meta-topolin; NAA; *Petunia hybrida* Hort. ex Vilmor; micropropagation

cytokinin khác [7]. mT và các dẫn xuất của nó đã được sử dụng để nuôi cấy và giúp hạn chế các vấn đề trong vi nhân giống (hiện tượng thùy tinh thể, hoại tử đầu chồi, ra rễ kém, tỉ lệ cây sống sau quá trình huấn luyện thích nghi thấp) [8]. Hiện nay, chưa có nghiên cứu nào sử dụng mT trong quá trình nhân chồi cây Dạ Yến Thảo.

Khi được chuyển ra vườn ươm, cây con hậu cấy mô cần một qui trình chăm sóc phù hợp để thích nghi với điều kiện mới, hình thành bộ rễ khỏe giúp cây hấp thụ nước và chất dinh dưỡng. Trong đó, giá thể được nhận thấy là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả của quá trình huấn luyện thích nghi cây con. Việc sử dụng giá thể phù hợp sẽ giảm tỉ lệ cây chết khi đưa ra trồng ngoài vườn ươm [9]. Xơ dừa là một phụ phẩm nông nghiệp phổ biến. Xơ dừa được sử dụng rộng rãi làm giá thể trồng cây nhờ vào cấu trúc đặc biệt cùng với các tính chất vật lý và hoá học của chúng. Giá thể xơ dừa có khả năng giữ nước vượt trội, giàu kali và các khoáng vi lượng như Fe, Mn, Zn và Cu [10]. Xơ dừa thường được trộn với một số loại giá thể khác nhằm tăng độ xốp và giá trị dinh dưỡng như phân hữu cơ động vật hoặc các loại giá thể hỗ trợ khác.

Nghiên cứu tiến hành khảo sát ảnh hưởng của mT và các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác lên quá trình nhân nhanh chồi và ra rễ cây Dạ Yến Thảo *in vitro*. Bên

¹ Ho Chi Minh University of Technology, Vietnam (Vo Thanh Phuc, Nguyen Hoang Huynh)

² Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam (Vo Thanh Phuc, Nguyen Hoang Huynh)

³ Department of Science and Technology, Ben Tre, Vietnam (Vo Thanh Truyen)

canh đó, nghiên cứu cũng tiến hành khảo sát và đánh giá loại giá thể phù hợp khi chuyển cây ra vườn ươm, giúp nâng cao tỉ lệ sống của cây con.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và điều kiện nuôi cấy

Mẫu cây là để hoa Dạ Yến Thảo đơn màu hồng phấn (*Petunia hybrida* Hort. ex Vilmor.) được trồng tại nhà lưới của khu ứng dụng Công nghệ sinh học Cái Môn, Bến Tre. Mẫu được rửa dưới vòi nước máy trong 10 phút. Sau đó, mẫu được khử trùng với cồn 70% trong 1 phút. Javel 25% (v/v) trong 15 phút. Sau đó, mẫu được cấy lên môi trường Murashige và Skoog (MS) [11] có bổ sung BA 0,5 mg/l.

Các hoá chất trong môi trường MS được cung cấp bởi công ty Xilong (Trung Quốc). Các chất điều hoà sinh trưởng BA, kinetin, NAA được cung cấp bởi công ty Himedia (Ấn Độ). mT được cung cấp bởi công ty Duchefa, Hà Lan.

Các mẫu *in vitro* được nuôi ở điều kiện nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, chiếu sáng 3000 lux, 12 giờ/ngày.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ BA, NAA lên khả năng tái sinh chồi cây Dạ Yến Thảo

Sau 14 ngày nuôi cấy, các mẫu để hoa đã vô trùng được cấy chuyển sang môi trường MS có bổ sung sucrose 30 g/L, agar 7 g/L, BA (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3 mg/L) và NAA (0; 0,1 mg/L). Môi trường không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng thực vật được sử dụng làm môi trường đối chứng. Số chồi/mẫu và hình thái chồi được ghi nhận sau 14 ngày nuôi cấy.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của BA, Kinetin và mT lên khả năng nhân nhanh cụm chồi cây Dạ Yến Thảo

Cụm chồi được cắt thành những cụm nhỏ (đường kính 1 cm) được cấy vào môi trường nhân chồi. Môi trường được sử dụng là môi trường MS bổ sung sucrose 30 g/L, agar 7 g/L, BA, kinetin hoặc mT với các nồng độ khác nhau (0,5; 1,0; 1,5 mg/L). Môi trường không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng thực vật được sử dụng làm môi trường đối chứng. Số chồi/mẫu, chiều cao và hình thái chồi được ghi nhận sau 14 ngày nuôi cấy.

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của khoáng đa lượng và nồng độ NAA lên sự hình thành rễ ở cây Dạ Yến Thảo

Các chồi có chiều cao 2,5 cm được tách ra và cấy lên môi trường MS và $\frac{1}{2}$ MS (nồng độ các khoáng đa lượng NH_4NO_3 , KNO_3 , CaCl_2 , MgSO_4 , KH_2PO_4 giảm lần lượt còn $\frac{1}{2}$, khoáng vi lượng giữ nguyên) bổ sung sucrose 30 g/L, than hoạt tính 0,5 g/L, agar 7 g/L, NAA 0; 0,5; 1 mg/L. Chiều cao cây, số rễ, chiều dài rễ và hình thái cây được ghi nhận sau 21 ngày nuôi cấy.

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của loại giá thể đến khả năng sống của cây mô giai đoạn vườn ươm

Các cây con được rửa sạch phần rễ, loại bỏ agar, ngâm rễ trong dung dịch diệt nấm COC 85 trong 5 phút. Sau đó, các cây được cắt bỏ ngọn (chia cây làm đôi theo chiều dài cây, sau đó dùng dao lam cắt bỏ phần trên) được trồng vào khay xốp ươm cây 112 lỗ. Cây được tưới phun sương ướn đều và khay ươm cây được cho vào túi nilon bọc kín. Ba

loại giá thể được sử dụng là mụn xơ dừa, mụn xơ dừa và trấu, mụn xơ dừa và phân bò (tỉ lệ 1:1). Mỗi ngày, túi nilon được mở ra để quan sát cây và tưới phun sương 2 – 3 ngày/lần vào chiều mát. Sau 15 ngày, các cây con còn sống sẽ được chuyển vào chậu nhựa nhỏ (cao 8 cm, đường kính 8 cm) với cùng loại giá thể đã được sử dụng lúc đầu và trồng trong nhà lưới của khu ứng dụng sinh học Cái Môn, Bến Tre. Điều kiện trồng như sau: Ánh sáng được che phủ 85%, nhiệt độ ban ngày $32 \pm 2^\circ\text{C}$, nhiệt độ ban đêm $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Các cây tiếp tục được tưới phun sương 2 – 3 ngày/lần vào lúc chiều mát và theo dõi khả năng sống đến ngày thứ 30. Chiều cao cây, số lá, số rễ, chiều dài rễ, tỉ lệ sống, hình thái cây được ghi nhận sau 30 ngày trồng.

2.3. Bố trí thí nghiệm và phân tích dữ liệu

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên. Mỗi bình cấy 1 mẫu, mỗi nghiệm thức được tiến hành với 10 bình, lặp lại 3 lần. Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của các loại giá thể ngoài vườn ươm được tiến hành với 30 mẫu/nghiệm thức, lặp lại 3 lần.

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm thống kê SPSS phiên bản 2019. Số liệu được phân tích ANOVA 1 yếu tố để đánh giá sự khác biệt giữa các nghiệm thức. Nếu sự khác biệt này có ý nghĩa sẽ được phân hạng theo trắc nghiệm Duncan's Multiple Range Test ($\alpha = 0,05$).

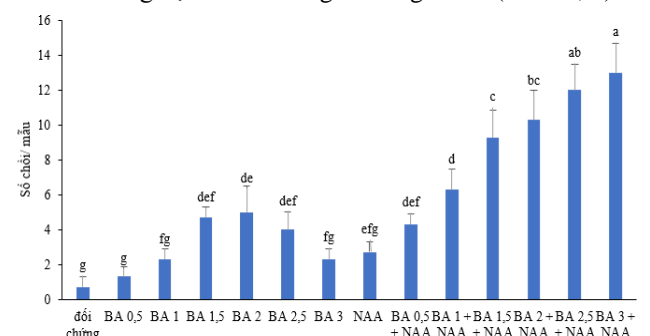
2.4. Các chỉ tiêu theo dõi

Số chồi/mẫu cây: Đếm tất cả số chồi trên từng mẫu. Chiều cao chồi: Đo từ gốc đến chồi ngọn bằng thước đo có chia vạch đến mm. Số lá/cây: Đếm số lá mở hoàn toàn có trên cây. Số rễ: Đếm các rễ hình thành trên mỗi mẫu. Chiều dài rễ: Đo từ gốc cho đến chóp rễ bằng thước đo có chia vạch đến mm. Khối lượng tươi: Mẫu được thấm khô bằng giấy thấm. Sau đó, mẫu được đặt lên cân phân tích và ghi nhận số liệu. Khối lượng khô: Mẫu đã xác định khối lượng tươi được đặt vào tủ sấy có nhiệt độ 60°C cho đến khi khối lượng không đổi, cân và ghi nhận lại số liệu.

3. Kết quả nghiên cứu và khảo sát

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ BA, NAA lên khả năng tái sinh chồi cây Dạ Yến Thảo

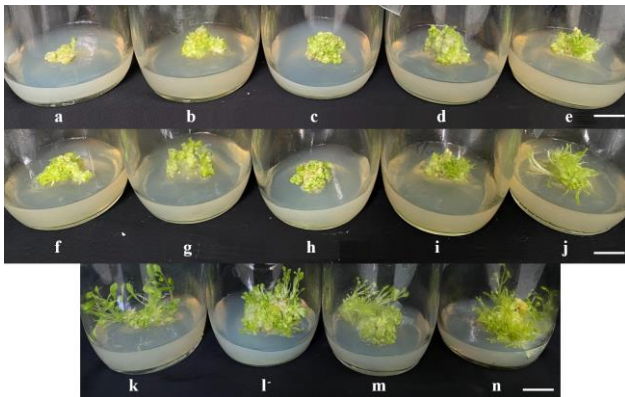
Sau 14 ngày nuôi cấy, trên môi trường chỉ bổ sung BA, các sẹo dạng chác hình thành nhiều nhưng số chồi tái sinh ít, mô sẹo tăng kích thước là chủ yếu. Trong khi đó, môi trường nuôi cấy có bổ sung BA kết hợp với NAA đã thúc đẩy quá trình phân hóa chồi. Số chồi tạo thành đều cao hơn so với các nghiệm thức không bổ sung NAA (Hình 1, 2).



Hình 1. Ảnh hưởng của BA (0,5 – 3 mg/L) và NAA 0,1 mg/L lên khả năng tái sinh chồi cây sau 14 ngày nuôi cấy

Khi tăng dần nồng độ BA từ 0,5 - 3 mg/L kết hợp với NAA 0,1 mg/L, số chồi tạo thành có xu hướng tăng dần. Ở nồng độ BA 3 mg/L kết hợp với NAA 0,1 mg/L, số chồi đạt cao nhất (13 chồi/cụm). Tuy nhiên, ở nghiệm thức này, trên cụm chồi có xuất hiện nhiều sẹo trắng không phân hoá thành chồi. Ở nồng độ BA 2,5 mg/L và NAA 0,1 mg/L, số chồi đạt được cũng khá cao (12 chồi/ cụm), các chồi cao và lá to.

Nghiệm thức có bổ sung NAA cho khả năng tái sinh chồi tốt hơn so với nghiệm thức không bổ sung NAA. Điều này cho thấy sự bổ sung NAA ngoại sinh là cần thiết cho quá trình tái sinh chồi. Kết quả này tương tự với các nghiên cứu khác trên cây Dạ Yến Thảo. Bùi Thị Cúc cũng nhận thấy ở nồng độ BA 0,75 mg/L và NAA 0,1 mg/L cho đường kính cụm chồi (2,63 cm) và chiều cao chồi (2,8 cm) tốt nhất khi vi nhân giống cây Dạ Yến Thảo [2]. Cui đã khảo sát sự kết hợp của các nồng độ cytokinin khác nhau với NAA 0,1 mg/L đối với sự nhân giống và tăng sinh chồi của *Petunia hybrida*. Môi trường thích hợp để tăng sinh chồi là MS + BA 1,6 mg/L + NAA 0,1 mg/L [12]. Các chất điều hòa sinh trưởng có tác dụng điều chỉnh sự phát sinh chồi bất định. Trong đó, cytokinin có vai trò quan trọng. Cytokinin sẽ kích thích tế bào để nó tự tổng hợp các chất cần thiết cho sự phân chia tế bào với điều kiện có auxin. Sau sự phân chia là giai đoạn dẫn của tế bào giúp tế bào tăng trưởng về kích thước và phát sinh các cơ quan. Ở giai đoạn này auxin có vai trò quan trọng, kích thích sự dẫn nơ của tế bào theo chiều ngang. Khi kết hợp giữa auxin và cytokinin, hiệu quả hình thành chồi bất định sẽ tăng cao [13].



Hình 2. Hình thái chồi tái sinh trên các môi trường bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác nhau sau 14 ngày nuôi cấy.

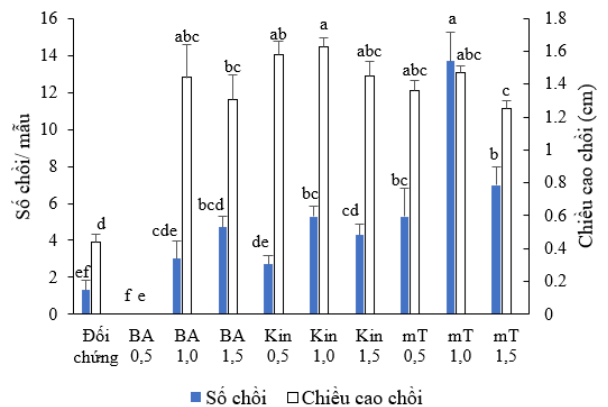
(a) Đối chứng; (b-g) BA 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3 mg/L; (h) NAA 0,1 mg/L; (i-n) NAA 0,1 mg/L và BA 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3 mg/L (thanh kích thước 1 cm)

Như vậy, nghiệm thức bổ sung BA 2,5 mg/L kết hợp với NAA 0,1 mg/L là phù hợp cho sự tái sinh chồi ở cây Dạ Yến Thảo.

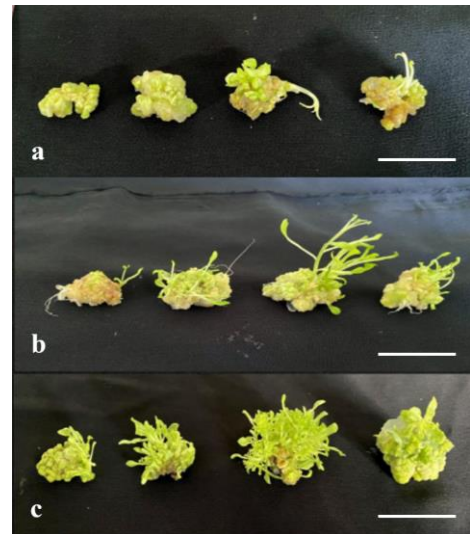
3.2. Ảnh hưởng của nồng độ BA, Kinetin và mT lên khả năng nhân cụm chồi cây Dạ Yến Thảo

Sau 14 ngày nuôi cấy, trên môi trường bổ sung BA ở nồng độ 0,5 mg/L, mẫu chưa xuất hiện chồi. Trên môi trường có BA từ 1 - 1,5 mg/L, mẫu cấy bắt đầu xuất hiện các chồi nhỏ. Nghiệm thức bổ sung BA 1,5 mg/L cho kết quả tốt nhất với 4,7 chồi/cụm, chiều cao chồi 1,31 cm. Về mặt hình thái, trên môi trường có bổ sung BA, mẫu cấy không hình thành chồi hoặc chồi thấp, có màu xanh nhạt hoặc vàng nhạt (Hình 4a).

Ở các nghiệm thức bổ sung kinetin, sau 14 ngày, một số mẫu cấy xuất hiện các chồi cao. Ở nghiệm thức bổ sung kinetin 1 mg/L, các chỉ tiêu như số chồi tạo thành (5,3 chồi/cụm), chiều cao chồi (1,63 cm) là cao nhất. Có thể thấy, kinetin kích thích kéo dài chồi ở cây Dạ Yến Thảo. Về hình thái mẫu, ở nghiệm thức bổ sung kinetin 1 mg/L, cụm chồi chắc chắn, chồi có màu xanh và vươn dài (Hình 4b).



Hình 3. Ảnh hưởng của BA, kinetin và mT lên khả năng nhân chồi cây sau 14 ngày nuôi cấy



Hình 4. Hình thái mẫu trên các nghiệm thức bổ sung các loại cytokinin khác nhau sau 14 ngày nuôi cấy.

(a) BA; (b) Kinetin; (c) mT (từ trái sang phải: nồng độ 0; 0,5; 1,0; 1,5 mg/L) (thanh kích thước 2 cm)

Với các nghiệm thức bổ sung mT, sau 14 ngày nuôi cấy, các mẫu cấy xuất hiện khá nhiều chồi. Nghiệm thức bổ sung mT 1 mg/L cho kết quả tốt nhất (13,7 chồi/ mẫu cấy, chiều cao chồi là 1,47 cm). Về mặt hình thái, các chồi khỏe, đồng đều (Hình 4c).

Như vậy, khi bổ sung từng loại cytokinin (BA, kinetin, mT) trong cùng thời gian nuôi cấy là 14 ngày, các nghiệm thức có bổ sung mT tỏ ra hiệu quả hơn, rút ngắn thời gian nhân nhanh và tạo chồi so với các nghiệm thức sử dụng BA hoặc kinetin. Kết quả này cũng cho thấy, sử dụng mT ở giai đoạn nhân chồi cho hiệu quả cao hơn so với các nghiên cứu trước. Phạm Phương Thu nhận thấy, mẫu cấy tạo mô sẹo sau 2 tuần bổ sung BAP vào môi trường nhân chồi, mô sẹo tiếp tục phát triển tạo thành cụm chồi sau 5 tuần nuôi cấy [4]. Farooq và cộng sự nhận thấy, BAP 0,5 mg/L và IBA

0,5 mg/L giúp nhân nhanh chồi Dạ Yến Thảo *Petunia hybrida* Vilm. Cv. “Bravo” tốt nhất (số chồi thu được là 20,5 chồi/ mẫu sau 6 tuần nuôi cấy) [3]. Như vậy, trong nghiên cứu này, việc sử dụng mT đã giúp rút ngắn thời gian nhân chồi mà hệ số nhân chồi vẫn đạt được khá cao (13,7 chồi/ mẫu cấy chỉ sau 2 tuần nuôi cấy). mT đã được sử dụng thành công trong quá trình tái sinh và nhân chồi ở nhiều loài thực vật khác nhau. Các cytokinin có nguồn gốc tự nhiên như mT đã được chứng minh có vai trò quan trọng trong việc trì hoãn quá trình lão hóa, tăng khả năng quang hợp, cải thiện sự phát triển của rễ và chồi [14]. Elayaraja đã báo cáo rằng bổ sung mT ở nồng độ 6,21 μM vào môi trường MS đã tạo ra số lượng chồi cây *Sesamum indicum* (L.) cao nhất (23,36 chồi/ mẫu) so với các môi trường bổ sung BA. Bên cạnh đó, nhiều chồi thu được từ môi trường có chứa BA cho thấy hàm lượng H_2O_2 cao hơn đáng kể, hoạt động của enzyme chống oxy hóa (SOD, APX và CAT) được tăng cường và hàm lượng diệp lục tố thấp hơn so với các chồi thu được từ môi trường có bổ sung mT [14]. Khi nghiên cứu về quá trình tái sinh chồi cây *Pterocarpus marsupium* (Roxb.). Ahmad cũng nhận thấy, nghiệm thức bổ sung mT cho kết quả nhân chồi và tạo rễ tốt hơn các nghiệm thức có bổ sung BA [15].

Các mẫu cấy trên các môi trường bổ sung BA, kinetin và mT riêng lẻ đều hình thành chồi ở nồng độ thấp (0,5 - 1 mg/L). Khi tăng nồng độ cytokinin lên 1,5 mg/L, số lượng chồi tạo thành và chiều cao chồi giảm. Nguyên nhân có thể là do nồng độ cytokinin cao đã cản sự kéo dài của chồi.

Từ các số liệu và hình thái thu được, môi trường MS có bổ sung mT 1 mg/L cho hiệu quả nhân chồi tốt (số chồi đạt cao nhất là 13,7 chồi/cụm chỉ sau 14 ngày nuôi cấy) và thời gian để hình thành chồi nhanh hơn so với các nghiệm thức còn lại.

3.3. Ảnh hưởng của khoáng đa lượng và nồng độ NAA lên sự hình thành rễ ở cây Dạ Yến Thảo

Ở tất cả các nghiệm thức, tỉ lệ tạo rễ là 100%. Tuy nhiên, ở từng loại môi trường, chiều cao cây, số rễ tạo thành/ cây và chiều dài rễ có sự khác biệt (Bảng 1). Các chỉ tiêu đạt cao nhất ở nghiệm thức sử dụng môi trường khoáng MS bổ sung NAA 1 mg/l (chiều cao cây đạt 7,3 cm, số rễ/ cây là 13,7 và chiều dài rễ là 3,8 cm).

Bảng 1. Ảnh hưởng hàm lượng khoáng và nồng độ NAA lên sự hình thành rễ cây Dạ Yến Thảo sau 21 ngày nuôi cấy

Khoáng	NAA (mg/l)	Chiều cao cây (cm)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)
MS	0	5,1 \pm 0,69 ^c	7,3 \pm 2,08 ^{bc}	2,1 \pm 0,3 ^b
	0,5	8,7 \pm 0,71 ^a	9,0 \pm 2 ^b	3,7 \pm 0,34 ^a
	1	7,3 \pm 0,8 ^b	13,7 \pm 1,53 ^a	3,8 \pm 0,35 ^a
1/2 MS	0	3,8 \pm 0,85 ^d	4,0 \pm 1,0 ^d	1,9 \pm 0,51 ^b
	0,5	6,5 ^b \pm 0,36 ^b	8,7 \pm 2,1 ^b	2,5 \pm 0,6 ^b
	1	7,2 ^b \pm 0,35 ^b	4,7 \pm 1,15 ^{cd}	4,1 \pm 0,23 ^a

Ghi chú: Các chữ cái a, b, c... trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $P < 0,05$ trong phép thử Duncan

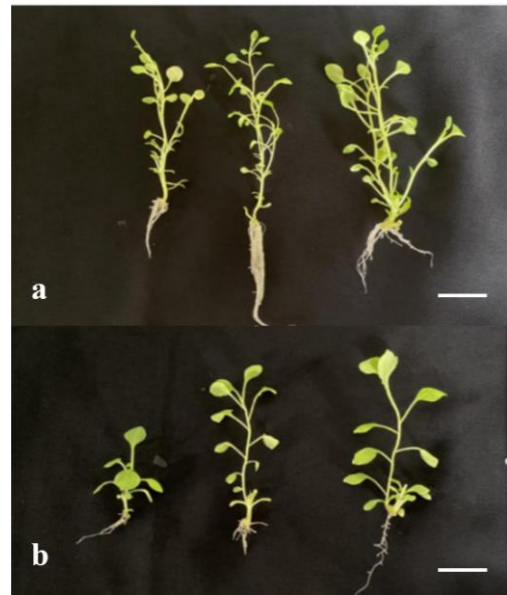
Ở môi trường 1/2 MS, rễ mảnh, yếu và có màu trắng nhạt. Về mặt hình thái, trên môi trường khoáng MS, chồi ra nhiều rễ, cây cao, các chồi bên phát triển mạnh. Trong

khí đó, các cây trên môi trường 1/2 MS có rễ ngắn, thân mảnh, chồi bên kém phát triển (Hình 5).

NAA là một auxin mạnh giúp thúc đẩy sự phân chia và mở rộng tế bào, kích thích hình thành rễ bất định,... được ứng dụng rộng rãi trong nhiều nghiên cứu trên cây Dạ Yến Thảo.

Việc sử dụng môi trường MS bổ sung NAA 1 mg/L cho hiệu quả tốt. Nguyên nhân có thể là do nhu cầu các khoáng đa lượng cao đối với giống cây này. Kết quả này tương tự với kết quả thu được của Bùi Thị Cúc và cộng sự trên cây Dạ Yến Thảo; chồi Dạ Yến Thảo có thể ra rễ ngay trên môi trường MS và môi trường MS bổ sung NAA 0,1 mg/L giúp chồi ra rễ tốt nhất [2].

Như vậy, từ các kết quả thu được, môi trường MS bổ sung NAA 1 mg/L là phù hợp cho quá trình ra rễ cây Dạ Yến Thảo.



Hình 5. Mẫu cây Dạ Yến Thảo trên môi trường ra rễ sau 21 ngày nuôi cấy (a) MS + NAA; (b) 1/2 MS + NAA. Từ trái sang phải: NAA 0; 0,5; 1,0 mg/L (thanh kích thước 2cm)

3.4. Ảnh hưởng của loại giá thể đến khả năng sống của cây mô giai đoạn vườn ươm

Bảng 2. Ảnh hưởng của loại giá thể lên khả năng sống của cây Dạ Yến Thảo ở giai đoạn ra vườn ươm sau 30 ngày

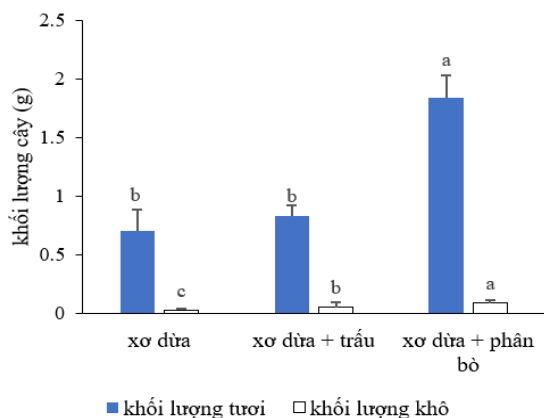
Giá thể	Chiều cao cây (cm)	Số lá	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Tỉ lệ sống (%)
Xơ dừa	3,1 \pm 0,35 ^b	8,8 \pm 1,64 ^b	12,2 \pm 2,28 ^a	2,7 ^c \pm 0,7 ^c	60 %
Xơ dừa + Trấu	4,0 \pm 0,3 ^a	12,6 \pm 1,14 ^a	25,6 \pm 5,64 ^b	4,0 \pm 0,6 ^b	66,7 %
Xơ dừa + Phân bò	4,3 \pm 0,3 ^a	12,2 \pm 1,8 ^a	34,4 \pm 3,58 ^a	6,4 \pm 0,3 ^a	80 %

Ghi chú: Các chữ cái a, b, c... trong cùng một hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $P < 0,05$ trong phép thử Duncan

Sau 30 ngày trồng, ở nghiệm thức chỉ sử dụng mụn xơ dừa, chiều cao cây đạt 3,1 cm; 8,8 lá/ cây; 12,2 rễ/ cây, chiều dài rễ 2,7 cm; tỉ lệ sống đạt 60%. Ở nghiệm thức này, các cây nhỏ, rễ thưa, lá xanh nhạt, các rễ phát triển chậm (Hình 7a). Nguyên nhân có thể là do mụn xơ dừa được ủ hoại có cấu trúc mịn, giảm độ thông khí, thoát khí và thoát nước, không có độ tơi xốp làm cản trở việc kéo dài của rễ.

Khi kết hợp mụn xơ dừa và trấu, chiều cao cây trung bình đạt 4 cm với 12,6 lá/cây; 25,6 rễ/cây; chiều dài rễ 4 cm; tỉ lệ sống đạt 66,7%. Cây cao, rễ khoẻ, lá to và xanh, cây phát triển tốt (Hình 7b). Như vậy, việc sử dụng kết hợp giữa mụn xơ dừa và trấu đã cải thiện tốt hơn nghiệm thức chỉ sử dụng mụn xơ dừa. Việc bổ sung trấu giúp cải thiện độ xốp của giá thể [16]. Trấu giúp tăng độ thoáng, giúp nước thoát ra được tốt hơn.

Khi kết hợp mụn xơ dừa và phân bò, chiều cao cây và số lá không khác biệt đáng kể so với 2 nghiệm thức trên. Tuy nhiên, số rễ và chiều dài rễ được cải thiện đáng kể (34,4 rễ/cây rễ và chiều dài rễ 6,4 cm). Cây cao, rễ khoẻ, lá to và xanh, phiến lá dày (Hình 7c). Khối lượng tươi và khối lượng khô cây cũng đạt cao nhất ở nghiệm thức này (Hình 6). Phân bò chứa nitơ, photpho, kali và nhiều chất dinh dưỡng thiết yếu khác như Ca, Mg, S, Zn, B, Cu, Mn... Ngoài việc cung cấp chất dinh dưỡng cho cây, phân bò còn cải thiện độ thoáng khí, khả năng giữ nước của đất và thúc đẩy sự phát triển của sinh vật đất có ích [17].



Hình 6. Ảnh hưởng của loại giá thể lên khối lượng cây Dendrobium ở giai đoạn ra vườn ươm sau 30 ngày



Hình 7. Mẫu cây Dendrobium sau 30 ngày ngoài vườn ươm, a: Xơ dừa, b: Xơ dừa + trấu, c: Xơ dừa + phân bò (thanh kích thước 2cm)

Phạm Phương Thu khi đưa cây con Dạ Yến Thảo ra vườn ươm sử dụng giá thể đất thịt + đất cát, cây không thể sống được vì đất thịt quá rắn, ít chất dinh dưỡng, cát lại dễ bị rửa trôi nên cây nhanh bị héo, thối vì không nhận được chất dinh dưỡng từ môi trường. Ở các giá thể còn lại (đất hữu cơ, đất thịt + cát + tro trấu + phân xanh) thì tỉ lệ sống cao hơn (30 – 45%), giá thể tơi xốp, giàu chất dinh dưỡng giúp cây dễ hấp thụ nên phát triển tương đối tốt [4]. Dạ Yến Thảo có nhu cầu nước cao nhưng nếu tưới nhiều nước sẽ có hiện tượng ngập úng và thối rễ khiến tỉ lệ sống của cây khi ra vườn thấp. Kết quả của nghiên cứu cho thấy, việc kết hợp mụn xơ dừa và phân bò cho tỉ lệ sống khá cao (80%). Việc sử dụng xơ dừa kết hợp với phân bò (tỉ lệ 1:1) đã cung cấp đầy đủ dinh dưỡng cho sự phát triển của cây.

Từ các số liệu và hình thái thu được, giá thể mụn xơ dừa và phân bò (tỉ lệ 1:1) là phù hợp cho giai đoạn đưa cây Dạ Yến Thảo cấy mô ra trồng ngoài vườn ươm.

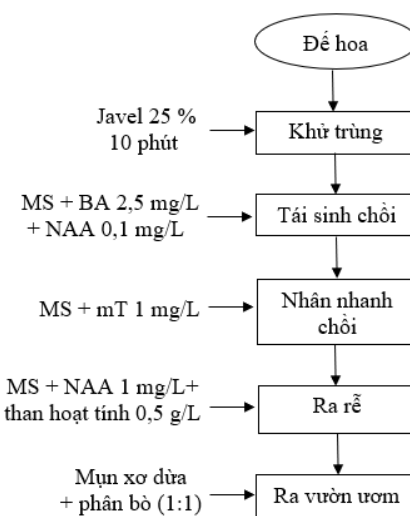
4. Kết luận

Môi trường tái sinh chồi Dạ Yến Thảo thích hợp nhất là môi trường MS có bổ sung BA 2,5 mg/L kết hợp với NAA 0,1 mg/L (số chồi đạt 12 chồi/cụm, các chồi khỏe, lá to sau 14 ngày nuôi cấy).

Việc bổ sung mT 1 mg/L đã giúp nhân nhanh chồi hiệu quả (số chồi đạt 13,7 chồi/cụm, chồi cao 1,47 cm sau 2 tuần nuôi cấy). Kết quả này cho thấy mT có tác động tích cực đến quá trình nhân chồi so với các cytokinin khác (BA và kinetin).

Môi trường phù hợp cho sự ra rễ của chồi Dạ Yến Thảo là môi trường MS bổ sung NAA 1 mg/L, than hoạt tính 0,5 g/L (100% mẫu ra rễ, cây cao 7,3 cm; 13,7 rễ; chiều dài rễ 3,8 cm sau 21 ngày nuôi cấy).

Giá thể thích hợp giúp cây sinh trưởng tốt khi được đưa ra vườn ươm là mụn xơ dừa kết hợp với phân bò (tỉ lệ 1:1) (tỉ lệ sống đạt cao nhất 80%).



Hình 8. Quy trình vi nhân giống Dạ Yến Thảo

Như vậy, quy trình trên thu được hệ số nhân chồi cao chỉ trong thời gian ngắn, từ đó rút ngắn được tổng thời gian vi nhân giống Dạ Yến Thảo. Bên cạnh đó, cây con thu được khỏe và đạt tỉ lệ sống cao khi được đưa ra trồng ở vườn

urom. Kết quả của nghiên cứu có thể ứng dụng vào sản xuất giống Dạ Yến Thảo nuôi cấy mô đại trà, cung cấp cây giống có chất lượng cao.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin cảm ơn Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc Gia Tp. Hồ Chí Minh, Khu ứng dụng công nghệ sinh học Cái Môn, Bến Tre đã hỗ trợ cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] P. H. Ho, *An Illustrated Flora of Vietnam*, TRE publishing house, 2000.
- [2] B. T. Cuc, D. H. Gioi, and B. T. T. Huong, "In vitro propagation of *Petunia hybrida*", *Journal of Forestry Science and Technology - VNUF*, vol. 7, pp. 3 – 10, 2017.
- [3] I. Farooq *et al.*, "Optimization of an improved, efficient and rapid in vitro micropropagation protocol for *Petunia hybrida* Vilm. Cv. "Bravo", *Saudi Journal of Biological Science*, vol. 28, no. 7, pp. 3701-3709, 2021.
- [4] P. P. Thu and P. T. T. Hien, "Rapid propagation of dark pink weeping *Petunia hybrida* Hort. Ex Vilm. - Andr. using tissue culture technique", *Scientific report on biological research and teaching in Vietnam - Scientific conference 4th national*, 2020, pp. 838 - 847.
- [5] M. Karimi, P.S. Monfared, and S.K. Kazemitabar, "Assessment of in vitro shoot formation in Iranian sesame (*Sesamum indicum* L.) cv. Naztaksakhe from cotyledon and hypocotyl explants", *Intl. J. Agric. Crop Sci.*, vol. 5, pp. 1827–1831, 2013.
- [6] M. Strnad, J. Hanuš, T. Vaněk, M. Kamínek, J. A. Ballantine, B. Fussell, and D. E. Hanke. "Meta-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus × canadensis* Moench, cv. Robusta)", *Phytochemistry*, vol. 45, no. 2, pp. 213-218, 1997.
- [7] A. O. Aremu, M. W. Bairu, K. Doležal, J. F. Finnie, and J. V. Staden, "Topolins: a panacea to plant tissue culture challenges?", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 108, no. 1, pp. 1-16, 2012.
- [8] N. Ahmad and M. Strnad, eds, *Meta-topolin: A Growth Regulator for Plant Biotechnology and Agriculture*, Springer Singapore, 2021.
- [9] M. S. Pirata, S. Correia, and J. Canhoto, "Ex vitro simultaneous acclimatization and rooting of in vitro propagated tamarillo plants (*Solanum betaceum* Cav.): Effect of the substrate and mineral nutrition", *Agronomy*, vol. 12, no. 5, p. 1082, 2022.
- [10] M. Z. Khan, M. D. Era, M. A. Islam, R. Khatun, A. Begum, and S. M. Billah, "Effect of coconut peat on the growth and yield response of *Ipomoea aquatica*", *American Journal of Plant Sciences*, vol. 10, no. 3, p. 369, 2019.
- [11] T. Murashige and F. Skoog, "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures". *Physiologia Plantarum*, vol. 15, no. 3, pp. 473 – 497, 1962.
- [12] G. R. Cui, X. Y. Ye, Y. C. Liu, M. Xiao, L. L. Liao, and Y. Liu, "Hormonal types and concentrations affect shoot propagation and rooting rate of *Petunia hybrida*", *J. Wuhan Bot. Res.*, vol. 23, no. 4, pp. 389–392, 2005.
- [13] T. N. T. Anh, T. D. Chi, and V. V. Vũ, "Effect of growth regulators on the morphogenesis from leaf explant of *Pogostemon cablin* (Blaco) Benth in vitro", *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, vol. 24, no. 1, pp. 44-49, 2008.
- [14] D. Elayaraja *et al.*, "Meta-Topolin (mT) enhances the in vitro regeneration frequency of *Sesamum indicum* (L.)", *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 21, p. 101320, 2019.
- [15] A. Ahmad and M. Anis, "Meta-topolin Improves In Vitro Morphogenesis, Rhizogenesis and Biochemical Analysis in *Pterocarpus marsupium* Roxb.: A Potential Drug-Yielding Tree", *J Plant Growth Regul.*, vol. 38, pp. 1007–1016, 2019.
- [16] A. Mishra, K. Taing, M.W. Hall, and Y. Shinogi, "Effects of rice husk and rice husk charcoal on soil physicochemical properties, rice growth and yield", *Agricultural Sciences*, vol. 8, no. 9, pp. 1014-1032, 2017.
- [17] A. Raj, M. K. Jhariya, and P. Toppo, "Cow dung for eco-friendly and sustainable productive farming", *Environ Sci*, vol. 3, no. 10, pp. 201-202, 2014.