DOI: 10.31276/VJST.63(7).53-56

Nghiên cứu tạo nguồn vật liệu khởi đầu trong nhân giống *in vitro* cây hoa Dạ yến thảo (*Petunia hybrida* L.)

Nguyễn Tiến Long[1*], Lã Thị Thu Hằng[1, 2], Trần Thị Triêu Hà[1, 2], Dương Thanh Thủy[1, 2], Lê Như Cương[1]

[1]Nhóm nghiên cứu công nghệ cao trong trồng trọt, Đại học Huế
[2]Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

Ngày nhận bài 2/2/2021; ngày chuyển phản biện 8/2/2021; ngày nhận phản biện 19/3/2021; ngày chấp nhận đăng 26/3/2021

Tóm tắt:

Với mục đích tạo nguồn vật liệu khởi đầu cho nhân giống *in vitro* cây hoa Dạ yến thảo, nghiên cứu này đã xác định được phương pháp khử trùng và môi trường dinh dưỡng trong các giai đoạn khác nhau: tái sinh chồi, nhân nhanh chồi và các cơ quan sinh dưỡng của cây *in vitro* sử dụng để nhân nhanh. Kết quả cho thấy, sử dụng đoạn thân mang mắt ngủ làm nguồn nguyên liệu khởi đầu và khử trùng bằng dung dịch $HgCl_2$ nồng độ 0,1% trong thời gian 10 phút cho hiệu quả khử trùng tốt nhất (tỷ lệ mẫu sống đạt 60%). Môi trường tái sinh chồi từ đoạn thân mang mắt ngủ tốt nhất là: MS + 1 mg BAP/l + 6,5 g agar/l + 30 g sacarose/l (tỷ lệ mẫu tạo chồi 100%, số chồi trung bình/mẫu đạt 2,73); môi trường nhân nhanh chồi tốt nhất là MS + 1 mg BA/l + 0,2 mg IBA/l + 6,5 g agar/l + 30 g sacarose/l (số chồi trung bình/mẫu đạt 19,53). Mô lá của cây *in vitro* là cơ quan sinh dưỡng phù hợp nhất để nhân nhanh, 100% các chồi *in vitro* tái sinh thông qua hình thức mô sẹo, tỷ lệ số chồi/mẫu đạt 21,53.

Từ khóa: **hoa Dạ yến thảo, nuôi cấy *in vitro*, tái sinh chồi.**

Chỉ số phân loại: **4.6**

Đặt vấn đề

Dạ yến thảo (*Petunia hybrida* L.) thuộc họ Cà (Solanaceae) là loài cây thân thảo mềm, ưa sáng, chịu nhiệt, nở nhiều hoa, thời gian nở hoa dài và rất phong phú về màu sắc hoa (trắng, hồng, đỏ, tím...) và kiểu dáng cây [1]. Phần lớn Dạ yến thảo trồng ngày nay được lai tạo từ *Petunia axillaris*, *Petunia violacea* và *Petunia inflata*.

Hiện nay, ở Việt Nam cây hoa Dạ yến thảo được trồng chủ yếu từ hạt với giá hạt tương đối đắt (từ 1.000 đến 5.000 đ/hạt tùy thuộc vào dạng cây và màu sắc hoa), cộng thêm vào đấy, kích cở hạt rất nhỏ, tỷ lệ nảy mầm chỉ khoảng 60-65%, tỷ lệ chết cao nên giá thành cây giống khá cao. Dạ yến thảo còn có thể nhân giống bằng phương pháp giâm cành nhưng có nhược điểm là cần lượng cây mẹ lớn, hệ số nhân giống thấp, cây con sinh trưởng kém và dễ nhiễn các loại bệnh… [2].

Vì những lý do đó, việc ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật để nâng cao hệ số nhân giống, cây giống tạo ra hoàn toàn sạch bệnh, đồng nhất về kiểu hình, ổn định về tính di truyền là hướng đi gần như tất yếu trong nền sản xuất nông nghiệp công nghệ cao hiện nay. Xuất phát từ nhu cầu thực tiễn của sản xuất, chúng tôi thực hiện "Nghiên cứu tạo nguồn vật liệu khởi đầu trong nhân giống *in vitro* cây hoa Dạ yến thảo (*Petunia hybrida* L.)".

Vật liệu và Phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Giống hoa Dạ yến thảo sử dụng để nghiên cứu có màu tím hồng, được nhập về từ Thái Lan.

Cây giống sử dụng để nghiên cứu đã phân cành dài 15-20 cm và chưa ra hoa.

Vật liệu nuôi cấy khởi đầu là đoạn thân mang mắt ngủ của cây giống khoẻ mạnh, không bị sâu bệnh.

Phương pháp nghiên cứu

Sử dụng các phương pháp nuôi cấy thường quy trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật.

Nghiên cứu phương pháp khử trùng tạo nguồn vật liệu khởi đầu (TN1): vật liệu là các đoạn thân mang mắt ngủ cùng chung một chế độ xử lý (rửa mẫu vật, khử trùng, môi trường dinh dưỡng…) với yếu tố thí nghiệm là các khoảng thời gian xử lý khác nhau (5, 7, 10 và 15 phút). Đánh giá kết quả tại thời điểm 2 tuần sau khi nuôi cấy.

Nghiên cứu tạo sự phát sinh chồi in vitro và nhân nhanh:

[*]Tác giả liên hệ: Email: nguyentienlong@huaf.edu.vn

A study on the primary materials for *in vitro* propagation of *Petunia hybrida* L.

Tien Long Nguyen[1*], Thi Thu Hang La[1, 2], Thi Trieu Ha Tran[1, 2], Thanh Thuy Duong[1, 2], Nhu Cuong Le[1]

[1]High Technology in Crop Production Group, Hue University
[2]University of Agriculture and Forestry, Hue University

Received 2 February 2021; accepted 26 March 2021

Abstract:

The aim of this study was to identify the primary materials for *in vitro* propagation of the *Petunia hybrida* L. The sterilisation method and the medium in different stages: shoot regeneration, rapid shoot multiplication, and the part of the *in vitro* plant used for rapid multiplication were identified. The study results showed that using nodal segments with axillary buds as the primary material and sterilising by $HgCl_2$ 0.1% in 10 minutes gave the best disinfection effect (survival rate reached 60%). Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1 mg of BAP/l + 6.5 g agar/l + 30 g sacarose/l was reported as the best one for shoot regeneration (100% of shoot formed and number shoot per sample was 2.73), meanwhile, the mixture of MS + 1 mgBA/l + 0.2 mg IBA/l + 6.5 g agar/l + 30 g sacarose/l was considered as the best medium for rapid shoot multiplication (average shoots/sample reached 19.53). *In vitro,* leaf tissue is the most suitable vegetative organ for rapid multiplication, 100% of *in vitro* shoots regenerate through the form of callus, and the ratio of shoots/sample reached 21.53.

Keywords: ***in vitro* propagation, *Petunia hybrida* L., shoots regeneration.**

Classification number: **4.6**

- Xác định ảnh hưởng của BAP đến khả năng tái sinh chồi *in vitro* (TN2): sử dụng môi trường MS + 30 g/l saccharose + 6,5 g/l agar và bổ sung BAP ở các nồng độ khác nhau (0-2 mg/l). Đánh giá thí nghiệm sau 6 tuần nuôi cấy.

- Xác định ảnh hưởng của tổ hợp BAP và IBA đến khả năng nhân nhanh chồi *in vitro* (TN3): môi trường nuôi cấy tương tự ở TN 2 với nồng độ BAP tốt nhất, bổ sung IBA với các mức nồng độ khác nhau (0, 0,1, 0,2, 0,3 và 0,4 mg/l). Đánh giá thí nghiệm sau 6 tuần nuôi cấy.

- Xác định nguồn thực liệu nuôi cấy mô phù hợp (TN4): các cơ quan sinh dưỡng khác nhau bao gồm: chồi ngọn *in vitro* dài 1 cm, đoạn thân *in vitro* mang mắt ngủ dài 1 cm, mảnh lá *in vitro* (1x1 cm) được cấy vào môi trường tốt nhất rút ra từ TN3. Đánh giá thí nghiệm sau 6 tuần nuôi cấy.

Các chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ mẫu nhiễm (%); tỷ lệ mẫu sạch (%); tỷ lệ mẫu sống (%); số mẫu tái sinh chồi; số chồi/mẫu; chiều cao chồi; số lá/chồi: hệ số nhân chồi; mẫu tạo callus; chất lượng chồi.

Điều kiện thí nghiệm: nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm nuôi cấy mô tế bào, Bộ môn Di truyền - giống, Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

Môi trường nuôi cấy MS [3] bổ sung saccarose, agar và các chất điều hòa sinh trưởng, pH 5,8, được khử trùng ở nhiệt độ 121^{o}C trong 20 phút.

Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD), 3 lần lặp lại mỗi lần 10 mẫu, theo dõi 30 mẫu, nhiệt độ 25±2^{o}C, cường độ ánh sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 14h/ngày.

Số liệu thí nghiệm được xử lý trên phần mềm Microsoft Excel và Statictis 10.0.

Kết quả và thảo luận

Xác định thời lượng khử trùng nguồn vật liệu khởi đầu

Hiệu quả của phương pháp khử trùng mẫu bằng $HgCl_2$ nồng độ 0,1% ở các khoảng thời gian 5, 7, 10 và 15 phút trên cơ quan sinh dưỡng đưa vào nuôi cấy là đoạn thân mang mắt ngủ được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến sự tạo nguồn vật liệu khởi đầu (sau 2 tuần nuôi cấy).

Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu sống và sạch (%)
5	96,67	0,00	3,33
7	73,33	16,67	10,00
10	**16,67**	**23,33**	**60,00**
15	0,00	93,33	6,67

Nhận xét được rút ra là tỷ lệ mẫu sống và sạch tăng theo chiều tăng của thời gian khử trùng trong phạm vi thời lượng từ 5 lên 10 phút. Cụ thể, ở thời gian khử trùng 10 phút, hiệu quả khử trùng đạt cao nhất với tỷ lệ mẫu sống và sạch đạt 60%, tỷ lê mẫu nhiễm 16,67%. Tuy nhiên, khi tăng thời gian khử trùng lên 15 phút thì tỷ lệ mẫu sống và sạch giảm rõ rệt, các mẫu theo dõi gần như chết hoàn toàn (93,33%). Điều này có thể được giải thích là do chất khử trùng $HgCl_2$

(0,1%) ngoài tác dụng diệt các vi sinh vật thì nó cũng gây độc cho mô nuôi cấy.

Thời gian khử trùng ảnh hưởng đến tỷ lệ mẫu sạch bệnh và mẫu nhiễm bệnh [4], thời gian khủ trùng ngắn thì tỷ lệ mẫu nhiễm tăng, tăng thời gian khử trùng thì tỷ lệ mẫu nhiễm giảm nhưng tỷ lệ mẫu chết lại tăng. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Wesely và cs (2011) [5], Johnson và cs (2011) [6].

Xác định nồng độ BA, tổ hợp BAP và IBA thích hợp trong giai đoạn phát sinh chồi và nhân nhanh

Nghiên cứu ảnh hưởng của BAP đến khả năng tái sinh chồi: BAP là một trong những cytokinin có ảnh hưởng rất rõ rệt đến sự hình thành và phân hóa cơ quan của thực vật, đặc biệt là sự phân hóa chồi trong nuôi cấy mô tế bào thực vật [7].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng các đoạn thân mang mắt ngủ hoàn toàn sạch vi sinh vật cấy vào môi trường có bổ sung BAP ở các nồng độ khác nhau (0-2 mg/l). Sau 6 tuần nuôi cấy, đánh giá khả năng tái sinh chồi và sinh trưởng của chồi *in vitro*, chúng tôi thu được kết quả ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tái sinh và sinh trưởng của chồi *in vitro*.

Công thức	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao trung bình/chồi (cm)	Chất lượng chồi
Đ/C	0,00	0.00^{d}	0.00^{e}	-
Đ/C + 0,5 mg BAP/l	100,00	1,57^{c}	1,57^{d}	+++
Đ/C + 1,0 mg BAP/l	**100,00**	**2,73^{a}**	**2,85^{a}**	**+++**
Đ/C + 1,5 mg BAP/l	100,00	2,03^{b}	2,41^{b}	++
Đ/C + 2,0 mg BAP/l	100,00	1,40^{c}	2,02^{c}	+
$LSD_{0,05}$		0,31	0,31	

Ghi chú: Đ/C: môi trường MS + 30 g/l saccharose + 6,5 g/l agar. Trong cùng 1 cột, các chữ a, b, c... thể hiện sự sai khác có ý nghĩa giữa các công thức về mặt thống kê ở mức =0,05 ; +++: chồi to, khỏe, lá màu xanh đặc trưng; ++: chồi nhỏ, lá bé màu xanh nhạt; +: chồi nhỏ, sinh trưởng yếu.

Số liệu ở bảng 2 cho thấy, BAP có vai trò quyết định đến khả năng tái sinh chồi và sinh trưởng của chồi *in vitro*. Tỷ lệ mẫu tạo chồi đạt 100% ở tất cả các công thức có bổ sung BAP, trong khi môi trường không bổ sung BAP hoàn toàn không có biểu hiện kích ứng tạo chồi. Trong phạm vi nồng độ BAP tăng từ 0,5 đến 1 mg/l, sự phát sinh chồi tăng theo chiều thuận với sự tăng nồng độ và cho hiệu quả phát sinh chồi cao nhất ở mức 1 mg BAP/l (tỷ lệ mẫu tạo chồi 100,00%, số chồi trung bình/mẫu đạt 2,73 chồi, chồi khoẻ, đồng đều, màu xanh đặc trưng). Khi tăng nồng độ BAP lên 2,0 mg/l, số chồi trung bình/mẫu đã giảm rõ rệt (chỉ còn 1,40 chồi), đồng thời một số chồi được tạo ra bắt đầu có những biểu hiện thay đổi về hình thái bên ngoài như chồi nhỏ, lá bị cong, mọng nước, xuất hiện các khối callus màu xanh nhạt, sinh trưởng chậm. Như vậy, môi trường thích hợp để tái sinh chồi là MS + 1 mg/l BAP + 6,5 g agar/l + 30 g saccarose/l. Kết quả này cao hơn chút ít so với Hassan và cs (2010) [8] trong một nghiên cứu tương tự và phù hợp với nghiên cứu của Bùi Thị Cúc và cs (2017) [2] khi sử dụng nguồn vật liệu khởi đầu để tái sinh là đoạn thân cho khả năng tái sinh tốt hơn so với việc sử dụng mô lá.

Nghiên cứu ảnh hưởng của tổ hợp BAP và IBA đến khả năng tăng hệ số nhân chồi và sinh trưởng của chồi: ảnh hưởng kết hợp giữa và BAP với IBA đến khả năng tái sinh chồi, tăng hệ số nhân chồi và sinh trưởng của chồi *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và IBA đến khả năng tăng hệ số nhân chồi và sinh trưởng của chồi (sau 8 tuần nuôi cấy).

Công thức	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao trung bình/chồi (cm)	Số lá trung bình/chồi (cái)
Đ/C	15,16^{b}	2.09^{bc}	4,40^{b}
Đ/C + 0,1 mg IBA/l	17,87^{a}	2.63^{ab}	4,63^{b}
Đ/C + 0,2 mg IBA/l	**19,53^{a}**	**2,80^{a}**	**5,17^{a}**
ĐC + 0,3 mg IBA/l	18,60^{b}	2,11^{bc}	3,62^{c}
ĐC + 0,4 mg IBA/l	9,43^{c}	1,57^{c}	3,20^{c}
$LSD_{0,05}$	1,93	0,67	0,49

Ghi chú: Đ/C: môi trường MS + 1,0 mg/l BAP + 30 g/l saccharose + 6,5 g/l agar. Trong cùng 1 cột, các chữ a, b, c... thể hiện sự sai khác có ý nghĩa giữa các công thức về mặt thống kê ở mức =0,05.

Kết quả bảng 3 cho thấy, có sự khác biệt rõ rệt khi kết hợp BAP và IBA trong môi trường nuôi cấy so với công thức đối chứng (chỉ bổ sung 1 mg BAP/l). Cụ thể, môi trường bổ sung 1 mg BAP/l kết hợp với 0,2 mg IBA/l cho kết quả tốt nhất, thể hiện ở số chồi được tạo ra nhiều nhất (19,53 chồi/mẫu), chiều cao chồi và số lá cũng lớn nhất. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ IBA lên 0,4 mg/l,, hệ số nhân chồi và chiều cao chồi thu được đều giảm so với công thức đối chứng. Như vậy, môi trường thích hợp để nhân nhanh chồi *in vitro* cây hoa Dạ yến thảo là MS + 1 mg BAP/l + 0,2 mg IBA/l + 6,5 g agar/l + 30 g saccarose/l. Kết quả nghiên cứu này cho hệ số nhân chồi cao hơn của Natanija và cs (2015) [9] khi nhân nhanh cây hoa Dạ yến thảo trên môi trường MS có bổ sung 0,8 mg/l BAP kết hợp với 0,1 mg/l NAA.

Xác định nguồn thực liệu nuôi cấy mô phù hợp

Một số cơ quan sinh dưỡng khác nhau bao gồm đoạn thân mang mắt ngủ, lá, chồi ngọn của cây *in vitro* được cấy vào môi trường dinh dưỡng cơ bản có bổ sung 1 mg BAP/l và 0,2 mg IBA/l nhằm xác định nguồn thực liệu phù hợp nhất thông qua các tiêu chí cơ bản như khả năng tạo chồi và chất lượng chồi sinh ra, kết quả được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của cơ quan nuôi cấy đến khả năng tạo chồi và sinh trưởng của chồi (sau 8 tuần nuôi cấy).

Công thức	Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chất lượng chồi
Đoạn thân mang mắt ngủ	100,00	19,24	Chồi nhỏ, màu xanh đặc trưng
Chồi ngọn	100,00	18.17	Chồi nhỏ, màu xanh đặc trưng
Mô lá	**100,00**	**21,53**	**Chồi mập, màu xanh đặc trưng**
$LSD_{0,05}$		*1,39*	

Số liệu bảng 4 cho thấy, ở cả 3 cơ quan sử dụng để nuôi cấy tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo đều đạt 100%, sau đó tất cả các mô sẹo này đều phát triển tạo nên cụm chồi. Như vậy, sự kết hợp giữa BAP và IBA với tỷ lệ thích hợp có tác dụng kích thích sự hình thành callus và phân hóa các tế bào callus thành các chồi, trong đó mô lá cho kết quả tốt nhất, tỷ lệ mẫu tạo chồi 100%, số chồi/mẫu thu được cao nhất (21,53), chồi mập và có màu xanh đặc trưng. Kết quả nghiên cứu này cao hơn so với công bố của Hassan và cs (2010) [8] (bổ sung 2,0 mg/l BA vào môi trường nuôi cấy, tỷ lệ tái sinh cao nhất chỉ đạt 45%) và gần tương tự với nghiên cứu của Sara và Naglaa (2015) [10], Bùi Thị Cúc và cs (2017) [2].

Kết luận

Để tạo nguồn vật liệu khởi đầu cây hoa Dạ yến thảo bằng phương pháp *in vitro* có hiệu quả, cần thực hiện qua các bước sau đây:

1. Sử dụng đoạn thân mang mắt ngủ và khử trùng mẫu bằng $HgCl_2$ nồng độ 0,1% trong thời gian 10 phút đạt hiệu quả cao nhất, tỷ lệ mẫu sống và sạch đạt 60%.

2. Môi trường dinh dưỡng phù hợp để tái sinh chồi là MS + 1 mg/l BA + 6,5 g agar/l + 30 g saccarose/l. Tỷ lệ mẫu tạo chồi là 100%, số chồi/mẫu là 2,73. Môi trường dinh dưỡng phù hợp để nhân nhanh chồi là MS + 1 mg BA/l + 0,2 mg IBA/l + 6,5 g agar/l + 30 g saccarose/l. Số chồi/mẫu đạt 19,53, chiều cao chồi 2,65 cm.

3. Cơ quan sinh dưỡng sử dụng để nhân nhanh chồi là mô lá của cây *in vitro*, 100% các chồi *in vitro* tái sinh thông qua hình thức mô sẹo, số chồi/mẫu là 21,53.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Phạm Hoàng Hộ (2000), *Cây cỏ Việt nam*, Nhà xuất bản Trẻ.

[2] Bùi Thị Cúc, Đồng Huy Giới, Bùi Thị Thu Hương (2017), "Nhân nhanh *in vitro* cây Dạ yến thảo hoa hồng sọc tím (*Petunia hybridal*.)", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, **10**, tr.3-10.

[3] T. Murashige, F. Skoog (1962), "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", *Physiol. Plant*, **15**, pp.473-497.

[4] K.E. Danso, et al. (2011), "Effective decontamination and subsequent plantlet regeneration of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) *in vitro*", *International Journal of Integrative Biology*, **11**, pp.90-96.

[5] E.G. Wesely, M.A.A. Johnson, M.S. Kavitha, N. Selvan (2011), "Micropropagation of *Alternanthera sessilis* (L.) using shoot tip and nodal segments", *Iranian Journal of Biotechnology*, **9**, pp.206-212.

[6] M Johnson, E.G. Wesely, M.S. Kavitha, V. Uma (2011), "Antibacterial activity of leaves and inter-nodal callus extracts of *Mentha arvensis* L.", *Asian Pac. J. Trop. Med.*, **4**, pp.196-200.

[7] Nguyễn Hoàng Lộc (1998), *Giáo trình nuôi cấy mô tế bào thực vật*, Nhà xuất bản Trường Đại học Khoa học Huế.

[8] A.Q. Hassan, Anas Abu-Rayya, Y. Sami (2010), "*In vitro* regeneration and somaclonal varition *Petunia hybrida*", *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research,* **18**, pp.71-81.

[9] B. Natanija, B. Ausra, J. Vaida (2015), "*In vitro* regeneration from leaf explants of *Petunia hybrida* L.", *Journal of Propagation of Ornamental Plants*, **15**, pp.47-52.

[10] E.G. Sara, M.E. Naglaa (2015), "*In vitro* prelimilary study on *Petunia hybria* breading under Sodium Chloride stress condition", *Middle East Journal of Agriculture Research*, **4**, pp.867-872.