

# XÂY DỰNG HỆ THỐNG TÁI SINH CÂY DẠ YẾN THẢO KÉP ĐEN (*Petunia hybrida* Hort. ex Vilm.-Andr. cv. 'Midnight Gold') TỪ MÔ LÁ

Phạm Thị Huyền Trang<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Phương Dung<sup>1</sup>, Trần Thị Đào<sup>2</sup>, Phùng Thị Thu Hà<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>2</sup>Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

\*Tác giả liên hệ: [phungthithuha@vnua.edu.vn](mailto:phungthithuha@vnua.edu.vn)

Ngày nhận bài: 17.10.2024

Ngày chấp nhận đăng: 28.11.2024

## TÓM TẮT

Dạ yến thảo kép đen (*Petunia hybrida* Hort. ex Vilm.-Andr. cv. 'Midnight Gold'), thuộc họ Cà (Solanaceae), là cây hoa trồng chậu có giá trị cao và đang được ưa chuộng trên thị trường. Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Dạ yến thảo kép đen từ mô lá nhằm đáp ứng nhu cầu cây giống Dạ yến thảo cho thị trường. Các thí nghiệm một nhân tố được bố trí theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần nhắc lại. Kết quả cho thấy: môi trường MS bổ sung 1 mg/l BA, 30 g/l sucrose và 6,5 g/l agar thích hợp nhất để tái sinh chồi từ mô lá. Môi trường dưỡng chồi có nguồn gốc chồi ngọn phù hợp nhất là MS bổ sung 30 g/l sucrose, 5% nước dừa và 6,5 g/l agar. Môi trường dưỡng chồi có nguồn gốc đốt thân phù hợp nhất là MS bổ sung 30 g/l sucrose, 10% nước dừa và 6,5 g/l agar. Môi trường ra rễ thích hợp nhất là MS bổ sung 30 g/l sucrose, 0,1 g/l AC và 6,5 g/l agar. Cây con *in vitro* được trồng trên giá thể peatmoss thích nghi tốt sau 4 tuần ra ngôi với tỷ lệ sống đạt 75%, chiều cao cây đạt 7,83cm, số lá đạt 16,55 lá/cây.

Từ khóa: BA, dạ yến thảo kép đen, hệ thống tái sinh, NAA, than hoạt tính.

## Establishment of a High-Efficiency Regeneration System for *Petunia hybrida* Hort. ex Vilm.-Andr. cv. 'Midnight Gold' from Leaf Tissues

## ABSTRACT

Black double petunia (*Petunia hybrida* Hort. ex Vilm.-Andr. cv. 'Midnight Gold'), belonging to the Solanaceae family, is a high - value and popular potted ornamental plant on the flower market. This study aimed to establish an efficient *in vitro* regeneration system for *Petunia hybrida* "Midnight Gold". A one-factor experiment was arranged in a completely randomized design with three replications. Leaf explants were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with various growth regulators and additives. The results showed that the optimal medium for shoot regeneration and multiplication was MS medium containing 1 mg/l benzyl adenine (BA) and 6.5 g/l agarose. For shoot development, MS medium with 30 g/l sucrose, 5% coconut water, and 6.5 g/l agarose was most effective for shoot tips, while 10% coconut water was preferred for nodal explants. Rooting was successfully induced on MS medium supplemented with 30 g/l sucrose, 0.1 g/l activated charcoal, and 6.5 g/l agarose. Acclimatized plantlets exhibited a 75% survival rate, reaching an average height of 7.83cm and producing 16.55 leaves per plant within four weeks. These findings provide a valuable protocol for *Petunia hybrida* "Midnight Gold" *in vitro* mass propagation, meeting the increasing market demand for this popular ornamental species.

Keywords: Activated charcoal, BA, NAA, *Petunia hybrida* Hort. ex Vilm.-Andr. cv. 'Midnight Gold', regeneration system.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dạ yến thảo (*Petunia* spp.) còn có tên là Dạ yến thảo, Dã yến thảo, Yên thảo hoa, là một

trong những loài hoa trồng chậu để trang trí trong nhà, ban công, đường phố, công viên... phổ biến trên toàn thế giới. Dạ yến thảo bao gồm các loài, loài lai và các giống lai thuộc chi

Dạ yến thảo, họ Cà (Solanaceae), lớp Hai lá mầm. Dạ yến thảo được chia làm 2 nhóm dựa vào cấu trúc hoa là Dạ yến thảo kép và Dạ yến thảo đơn. Cây 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 trong đó có Việt Nam, cây cao từ 0,3-1,0m, thân thảo với hình thái và màu sắc hoa đa dạng. Cây sai hoa, ra hoa quanh năm nếu được chăm sóc tốt (Phạm Hoàng Hộ, 2000).

Nhu cầu cây giống Dạ yến thảo ngày càng tăng, đặc biệt là các giống Dạ yến thảo cánh kép, các giống có màu sắc đặc biệt, mới du nhập vào Việt Nam. Dạ yến thảo thường được nhân giống bằng hạt hoặc giâm cành. Tuy nhiên, hạt Dạ yến thảo nhỏ và mất nhiều thời gian để xử lý nhân giống. Mặt khác, theo Bùi Thị Cúc & cs. (2017), hạt Dạ yến thảo có tỷ lệ nảy mầm không cao (60%), còn hệ số nhân giống bằng phương pháp giâm cành thấp, sức sống kém. Vì vậy, nguồn cung cây giống Dạ yến thảo cho thị trường hiện nay chủ yếu từ nuôi cấy mô tế bào thực vật.

Tại Việt Nam, các nghiên cứu nuôi cấy mô đã được tiến hành trên một số giống Dạ yến thảo phổ biến. Năm 2017, 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) cũng 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 với kết quả 100% các chồi *in vitro* tái sinh thông qua hình thức mô sẹo. Lê Bảo Phúc & cs. (2022) cũng đã nghiên cứu ảnh hưởng của nano bạc lên sự phát sinh chồi và phát sinh rễ của cây Dạ yến thảo (*P. hybrida*) *in vitro*. Võ Thanh Phúc & cs. (2023) đã thiết lập quy trình nhân *in vitro* hiệu quả cho giống Dạ yến thảo đơn màu hồng phấn từ đế hoa.

Mặc dù có rất nhiều nghiên cứu nhân giống *in vitro* Dạ yến thảo trong và ngoài nước đã được tiến hành, nhưng hiện có rất ít nghiên cứu được thực hiện trên các giống Dạ yến thảo kép. Do vậy, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu xây dựng hệ thống tái sinh *in vitro* cho giống Dạ yến

thảo kép đen đang được ưa chuộng trên thị trường nhằm cung cấp cây giống phục vụ nhu cầu của người trồng Dạ yến thảo.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Cây Dạ yến thảo kép đen (*Petunia hybrida* Hort. ex Vilm.-Andr. cv. 'Midnight Gold') được thu thập tại Đà Lạt và trồng tại 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, mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần ít nhất 20 mẫu.

*Giai đoạn tạo nguồn vật liệu khởi đầu và tái sinh chồi*

Lá Dạ yến thảo kép đen được khử trùng bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 10 phút (Farooq & cs., 2021) sau đó được rửa bằng nước cất vô trùng 2-3 lần. Lá sau khử trùng được cấy vào môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) có bổ sung 30 g/l sucrose, 6,5 g/l agar, pH 5,8. Sau 1 tuần, các lá xanh, không nhiễm nấm hoặc khuẩn được cắt thành các miếng 0,5 × 0,5cm và cấy vào môi trường MS + 30 g/l sucrose + 6,5 g/l agar, pH 5,8 với hàm lượng NAA hoặc BA từ 0,5-2,0 mg/l để tạo mô sẹo và tái sinh chồi. Các bình thí nghiệm sau đó giữ trong tối 1 tuần sau đó chuyển sang giá có đèn chiếu sáng theo chu kỳ.

Các chỉ tiêu được theo dõi sau 6 tuần nuôi cấy bao gồm: Tỷ lệ tạo mô sẹo (%) = (Số mẫu tạo mô sẹo/Tổng số mẫu) × 100; Tỷ lệ tái sinh chồi (%) = (Số mẫu tạo mô sẹo/Tổng số mẫu) × 100; Hình thái chồi (màu sắc, kích thước (mập, mảnh), thủy tinh hóa...).

#### *Giai đoạn dưỡng chồi*

Chồi ngọn *in vitro* tái sinh từ mô lá (cao 1,3-1,5cm, có 3-4 lá/chồi) và đoạn thân mang 1 mắt ngủ tái sinh từ mô lá, dài 0,5-0,7cm được cấy lên môi trường MS đặc với hàm lượng sucrose, nước dừa thay đổi tùy thí nghiệm.

Các chỉ tiêu được theo dõi sau 4 tuần nuôi cấy bao gồm; Đường kính thân (cm); Chiều cao chồi (cm); Số lá/chồi (lá/chồi); Chiều dài lá (cm); Chiều rộng lá (cm); Hình thái chồi (màu sắc, kích thước (mập, mảnh), thủy tinh hóa...).

#### *Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh*

Chồi *in vitro* của giống Dạ yến thảo kép đen sau giai đoạn dưỡng chồi, dài 2cm được cấy vào môi trường tạo cây hoàn chỉnh trên nền môi trường MS + 30 g/l sucrose + 6,5 g/l agar có bổ sung NAA ở các hàm lượng (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: Đường kính thân (cm); Chiều cao cây (cm); Số lá/cây (lá/chồi); Chiều dài lá (cm); Chiều rộng lá (cm); Số rễ trên cây (rễ/cây); Chiều dài rễ (cm); Hình thái rễ: màu sắc, kích thước (mập, mảnh).

#### *Giai đoạn vườn ươm*

Cây *in vitro* sau giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh được trồng trên các khay xếp 112 lỗ (kích thước Dài × Rộng × Cao: 56cm × 36cm × 4cm) với giá thể peatmoss (Hãng sản xuất: Nord-Agri (Litva); pH 5,5-6,5; EC 0,5-0,9 mS/cm; NPK ~ 1,2 kg/m<sup>3</sup>). Các chỉ tiêu được theo dõi trong 4 tuần, bao gồm: Tỷ lệ sống (%) = (Số lượng cây sống/Tổng số cây ra ngôi) × 100%; Chiều cao cây (cm); Số lá trên cây (lá/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 ở mức tin cậy 95%.

## **3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

### **3.1. Giai đoạn tạo mô sẹo và tái sinh chồi**

Ảnh hưởng của BA, NAA tới khả năng tạo mô sẹo và tái sinh chồi từ mô lá của giống Dạ yến thảo kép đen:

Mô sẹo là tập hợp các tế bào không phân hóa, có đặc tính phân chia mạnh, thường được hình thành từ sự phản biệt hóa của tế bào nhu mô và sự phân chia mạnh mẽ của tế bào vùng tượng tầng. Tạo mô sẹo là một bước trung gian để tái sinh chồi trong quá trình nuôi cấy *in vitro* ở thực vật. Hàm lượng các chất điều hòa sinh trưởng thực vật là một yếu tố chính kiểm soát việc hình thành mô sẹo và tái sinh chồi trong môi trường nuôi cấy. Nhóm chất điều hòa sinh trưởng auxin và cytokinin thường được bổ sung để giúp tăng khả năng cảm ứng hình thành mô sẹo và tái sinh chồi. Trong nghiên cứu này NAA (thuộc nhóm auxin) và BA (thuộc nhóm cytokin) được sử dụng riêng rẽ để đánh giá khả năng cảm ứng tạo mô sẹo và tái sinh chồi từ mô lá của giống Dạ yến thảo kép đen.

Mô lá của giống Dạ yến thảo kép đen không tạo mô sẹo trên môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng. Trên môi trường có NAA, mô lá có tạo mô sẹo nhưng không tái sinh chồi còn trên môi trường bổ sung BA, mô lá vừa tạo mô sẹo vừa tái sinh chồi. Tỷ lệ tạo mô sẹo và tái sinh chồi tăng dần với nồng độ BA từ 0,5-1,0 mg/l rồi giảm khi BA tăng lên 2,0 mg/l (Bảng 1). Đây là quy luật chung của các chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin nói chung và BA nói riêng. Chúng tôi đồng ý với nhận xét của Phan Xuân Huyền & Nguyễn Thị Phượng Hoàng (2017) rằng khi tăng dần hàm lượng BA thì kích thích sự tái sinh chồi, đến hàm lượng tối ưu thì sự tái sinh chồi đạt tốt nhất, nhưng khi vượt qua ngưỡng tối ưu thì sẽ gây ra hiện tượng ức chế sự tái sinh chồi hoặc làm cho mẫu bị chết.

Với giống Dạ yến thảo kép đen, mẫu mô lá cấy trên môi trường bổ sung 1 mg/l BA có khả năng hình thành mô sẹo và tái sinh chồi cao hơn các công thức còn lại, với tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo đạt 94,44% và tỷ lệ mẫu tái sinh chồi đạt

83,33%, sai khác có ý nghĩa với các công thức còn lại. Chồi tạo thành sinh trưởng tốt, lá có màu xanh đậm (Bảng 1). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Tiến Long & cs. (2021) khi bổ sung BA vào môi trường nuôi cấy để tái sinh đoạn thân *in vitro* giống Dạ yến

thảo tím hồng. Còn nghiên cứu của Hassan & cs. (2010) cho thấy môi trường phù hợp nhất để tái sinh chồi từ mô lá Dạ yến thảo “Mix color” là MS + 2,0 mg/l BA. Như vậy, mỗi giống Dạ yến thảo sẽ cảm ứng tạo mô sẹo và tái sinh chồi ở các hàm lượng BA khác nhau.

**Bảng 1. Ảnh hưởng của BA hoặc NAA đến khả năng tạo mô sẹo và tái sinh chồi *in vitro* từ mô lá của giống Dạ yến thảo kép đen sau 6 tuần nuôi cấy**

Hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng	Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)	Tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (%)	Đánh giá cảm quan	
ĐC	-	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>c</sup>	-
BA (mg/l)	0,5	83,33 <sup>ab</sup>	72,22 <sup>b</sup>	++
	1,0	94,44 <sup>a</sup>	83,33 <sup>a</sup>	+++
	1,5	77,78 <sup>ab</sup>	72,22 <sup>b</sup>	+
	2,0	72,22 <sup>bc</sup>	66,67 <sup>b</sup>	+
NAA (mg/l)	0,5	44,44 <sup>d</sup>	0,00 <sup>c</sup>	-
	1,0	61,11 <sup>cd</sup>	0,00 <sup>c</sup>	Mô sẹo màu trắng, xanh, xuất hiện rễ
	1,5	72,22 <sup>bc</sup>	0,00 <sup>c</sup>	
	2,0	77,78 <sup>ab</sup>	0,00 <sup>c</sup>	
LSD 0,05	19,23	7,34		
CV%	17,1	13		

Ghi chú: -: Không cảm ứng; +: Chồi sinh trưởng yếu, lá màu xanh nhạt; ++: Chồi sinh trưởng trung bình, lá màu xanh nhạt; +++: Chồi sinh trưởng tốt, lá màu xanh đậm; Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% trong phép thử Duncan).

**Bảng 2. Ảnh hưởng của sucrose đến chất lượng chồi của giống Dạ yến thảo kép đen sau bốn tuần nuôi cấy**

Vật liệu	Hàm lượng sucrose (g/l)	Đường kính thân (cm)	Chiều cao chồi (cm)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Số lá (lá/chồi)	
Chồi ngọn	20	0,10 <sup>b</sup>	4,25 <sup>d</sup>	1,34 <sup>c</sup>	0,46 <sup>b</sup>	8,17 <sup>d</sup>	
	30	0,12 <sup>a</sup>	6,89 <sup>a</sup>	1,67 <sup>a</sup>	0,57 <sup>a</sup>	13,22 <sup>a</sup>	
	40	0,12 <sup>a</sup>	6,21 <sup>b</sup>	1,54 <sup>b</sup>	0,53 <sup>a</sup>	11,83 <sup>b</sup>	
	50	0,12 <sup>a</sup>	5,12 <sup>c</sup>	1,52 <sup>b</sup>	0,52 <sup>ab</sup>	9,83 <sup>c</sup>	
	LSD 0,05		0,01	0,48	0,08	0,07	0,77
	CV%		3,0	4,3	2,7	6,9	3,6
Đốt thân	20	0,09 <sup>b</sup>	3,25 <sup>b</sup>	1,24 <sup>b</sup>	0,42 <sup>a</sup>	6,33 <sup>b</sup>	
	30	0,10 <sup>a</sup>	4,46 <sup>a</sup>	1,49 <sup>a</sup>	0,50 <sup>a</sup>	8,67 <sup>a</sup>	
	40	0,10 <sup>a</sup>	4,18 <sup>a</sup>	1,44 <sup>a</sup>	0,49 <sup>a</sup>	8,11 <sup>a</sup>	
	50	0,10 <sup>a</sup>	3,27 <sup>b</sup>	1,46 <sup>a</sup>	0,49 <sup>a</sup>	6,39 <sup>b</sup>	
	LSD 0,05		0,01	0,59	0,10	0,10	0,69
	CV%		3,3	7,8	3,4	10,4	4,7

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



### 3.2. Giai đoạn dưỡng chồi

Chất lượng chồi là một yếu tố quan trọng của quy trình nhân *in vitro*. Ở giai đoạn tái sinh chồi, mô sẹo tái sinh thành cụm chồi nên số lượng chồi trên một mẫu lớn, chồi thường mảnh, yếu. Vì vậy, chồi cần được trải qua giai đoạn dưỡng để nâng cao chất lượng, điều này sẽ làm tăng khả năng thích nghi của cây *in vitro* với môi trường bên ngoài vườn ươm. Trong giai đoạn dưỡng chồi, 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, sucrose và nước dừa được thêm vào với lượng khác nhau để đánh giá chất lượng của chồi *in vitro*.

#### 3.2.1. Ảnh hưởng của sucrose đến chất lượng chồi của giống Dạ yến thảo kép đen

Mô và tế bào thực vật nuôi cấy *in vitro* sống chủ yếu theo phương thức dị dưỡng, vì vậy việc đưa vào môi trường nuôi cấy nguồn carbon hữu cơ là điều bắt buộc. Đường là nguồn cung cấp carbon để mô thực vật tổng hợp nên các chất hữu cơ, giúp tế bào phân chia, tăng sinh khối. Trong nuôi cấy mô, sucrose là loại đường thông dụng nhất, là một trong những yếu tố kiểm soát cảm ứng và tăng trưởng của chồi *in vitro* (Ndagijimana & cs., 2014). Nhằm tìm ra công thức môi trường dưỡng chồi phù hợp nhất cho giống Dạ yến thảo kép đen, hai loại vật liệu bao gồm chồi ngọn và đốt thân *in vitro* được cấy vào môi trường MS + 6,5 g/l agar có bổ sung sucrose ở các hàm lượng khác nhau, kết quả được thống kê ở bảng 2.

Chồi *in vitro* có nguồn gốc chồi ngọn và đốt thân của giống Dạ yến thảo kép đen sinh trưởng chậm ở môi trường có hàm lượng sucrose thấp (20%) với các chỉ tiêu sinh trưởng thấp nhất, sai khác có ý nghĩa với các công thức còn lại. Khi hàm lượng sucrose trong môi trường nuôi cấy tăng thì các chỉ tiêu sinh trưởng đều tăng. Ở môi trường bổ sung 30-40 g/l sucrose hầu hết các chỉ tiêu tăng trưởng vượt trội so với các công thức khác. Tuy nhiên, khi hàm lượng sucrose ở 50 g/l thì các chỉ tiêu sinh trưởng của chồi đều giảm (Bảng 2). Theo Nowak & cs. (2004) có thể do áp suất thẩm thấu của môi trường tăng cao

khi tăng nồng độ sucrose đã dẫn đến sự ức chế sự sinh trưởng và phát triển của chồi.

Như vậy, với giống Dạ yến thảo kép đen, môi trường bổ sung 30 g/l sucrose là phù hợp nhất để dưỡng chồi có nguồn gốc cả chồi ngọn và đốt thân, với chiều cao chồi cao nhất đạt lần lượt 6,89cm và 4,46cm, sai khác có ý nghĩa với các công thức còn lại (Bảng 2). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu nhân nhanh giống Dạ yến thảo hồng tím (Bùi Thị Cúc & cs., 2017) và giống Dạ yến thảo 'Bravo' (Farooq & cs., 2021).

#### 3.2.2. Ảnh hưởng của nước dừa đến chất lượng chồi của giống Dạ yến thảo kép đen

Nước dừa được sử dụng rộng rãi trong nuôi cấy mô thực vật do có chứa đường, vitamin, khoáng chất, auxin, axit amin và hàm lượng cao các glucoside của cytokinin có tác dụng thúc đẩy quá trình phân chia tế bào, kích thích quá trình nhân nhanh tế bào và mô (Aguilar & cs., 2009; Yong & cs., 2009). Vì vậy, thí nghiệm này được tiến hành để đánh giá ảnh hưởng của nước dừa lên chất lượng chồi của giống Dạ yến thảo kép đen trong giai đoạn dưỡng chồi.

Kết quả cho thấy, ở môi trường không bổ sung nước dừa, các chồi *in vitro* có sự sinh trưởng chậm, chất lượng chồi kém hơn các công thức có bổ sung nước dừa, với các chỉ tiêu sinh trưởng đều thấp nhất, sai khác có ý nghĩa thống kê với các công thức còn lại. Khi bổ sung nước dừa từ 5-15% thì chồi *in vitro* sinh trưởng vượt trội, tuy nhiên khi tăng nồng độ nước dừa lên 20% thì các chỉ tiêu sinh trưởng của chồi đều giảm (Bảng 3). Nguyên nhân có thể do trong nước dừa chứa sucrose và cytokinin, nên khi nồng độ nước dừa tăng khiến hàm lượng sucrose và cytokinin cũng tăng lên, gây ức chế quá trình sinh trưởng của chồi (Yong & cs., 2009; Phan Xuân Huyền & Nguyễn Thị Phương Hoàng, 2017; Nowak & cs., 2004).

Môi trường bổ sung 5% nước dừa là phù hợp nhất để dưỡng chồi *in vitro* có nguồn gốc chồi ngọn với chiều cao chồi đạt 8,92cm, số lá đạt 17,06 lá/chồi, sai khác có ý nghĩa với các công thức còn lại. Đối với chồi có nguồn gốc từ đốt thân thì môi trường phù hợp nhất để dưỡng là

bổ sung 10% nước dừa, với chiều cao chồi lớn nhất (6,59 cm) và số lá nhiều nhất (12,94 lá/chồi), sai khác có ý nghĩa với các công thức còn lại (Bảng 3). Kết quả nghiên cứu của Phạm Thị Huyền Trang & cs. (2024) trên giống Dạ yến thảo cánh đơn hoa tím và của Borkird &

Sink (1983) trên chủng đại Dạ yến thảo *P. inflata* lại cho thấy nước dừa không có tác dụng thúc đẩy sự tăng trưởng của chồi *in vitro*. Như vậy, mỗi loài, giống, vật liệu tái sinh chồi khác nhau có cảm ứng với các nồng độ nước dừa khác nhau trong môi trường nuôi cấy.

**Bảng 3. Ảnh hưởng của nước dừa đến chất lượng chồi của giống Dạ yến thảo kép đen sau bốn tuần nuôi cấy**

Vật liệu	Nồng độ nước dừa (%)	Đường kính thân (cm)	Chiều cao chồi (cm)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Số lá (lá/chồi)
Chồi ngọn	0	0,12 <sup>c</sup>	6,87 <sup>c</sup>	1,66 <sup>b</sup>	0,57 <sup>a</sup>	13,11 <sup>d</sup>
	5	0,13 <sup>b</sup>	8,92 <sup>a</sup>	1,80 <sup>a</sup>	0,62 <sup>a</sup>	17,06 <sup>a</sup>
	10	0,13 <sup>b</sup>	7,88 <sup>b</sup>	1,78 <sup>a</sup>	0,61 <sup>a</sup>	15,06 <sup>b</sup>
	15	0,13 <sup>b</sup>	7,21 <sup>c</sup>	1,77 <sup>a</sup>	0,59 <sup>a</sup>	13,83 <sup>c</sup>
	20	0,14 <sup>a</sup>	6,05 <sup>d</sup>	1,80 <sup>a</sup>	0,61 <sup>a</sup>	11,56 <sup>e</sup>
	LSD 0,05	0,01	0,45	0,05	0,06	0,48
	CV%	1,9	3,2	1,5	5,6	1,8
Đốt thân	0	0,10 <sup>b</sup>	4,48 <sup>d</sup>	1,51 <sup>b</sup>	0,51 <sup>b</sup>	8,72 <sup>d</sup>
	5	0,10 <sup>b</sup>	5,87 <sup>b</sup>	1,69 <sup>a</sup>	0,57 <sup>ab</sup>	11,44 <sup>b</sup>
	10	0,10 <sup>b</sup>	6,59 <sup>a</sup>	1,72 <sup>a</sup>	0,58 <sup>ab</sup>	12,94 <sup>a</sup>
	15	0,10 <sup>b</sup>	6,03 <sup>b</sup>	1,70 <sup>a</sup>	0,56 <sup>ab</sup>	11,78 <sup>b</sup>
	20	0,11 <sup>a</sup>	5,16 <sup>c</sup>	1,74 <sup>a</sup>	0,60 <sup>a</sup>	10,06 <sup>c</sup>
	LSD 0,05	0,01	0,53	0,08	0,08	0,93
	CV%	4,3	5,0	2,5	7,2	4,5

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

**Bảng 4. Ảnh hưởng của NAA hoặc AC đến khả năng ra rễ *in vitro* của giống Dạ yến thảo kép đen sau 10 ngày nuôi cấy**

Hàm lượng chất bổ sung	Đường kính thân (cm)	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Số lá (lá/cây)	Chiều dài rễ (cm)	Số rễ (rễ/cây)	
ĐC	-	0,09 <sup>c</sup>	3,17 <sup>bc</sup>	1,62 <sup>ab</sup>	0,54 <sup>a</sup>	7,78 <sup>bc</sup>	2,52 <sup>a</sup>	10,17 <sup>c</sup>
NAA (mg/l)	0,1	0,09 <sup>c</sup>	2,18 <sup>e</sup>	1,60 <sup>ab</sup>	0,52 <sup>a</sup>	5,39 <sup>d</sup>	0,00 <sup>e</sup>	0,00 <sup>e</sup>
	0,3	0,09 <sup>c</sup>	2,06 <sup>e</sup>	1,58 <sup>b</sup>	0,53 <sup>a</sup>	5,11 <sup>d</sup>	0,00 <sup>e</sup>	0,00 <sup>e</sup>
	0,5	0,09 <sup>c</sup>	2,05 <sup>e</sup>	1,59 <sup>ab</sup>	0,52 <sup>a</sup>	5,06 <sup>d</sup>	0,00 <sup>e</sup>	0,00 <sup>e</sup>
AC (g/l)	0,1	0,11 <sup>a</sup>	3,58 <sup>a</sup>	1,65 <sup>a</sup>	0,56 <sup>a</sup>	9,06 <sup>a</sup>	2,38 <sup>a</sup>	15,11 <sup>a</sup>
	0,3	0,10 <sup>b</sup>	3,25 <sup>b</sup>	1,65 <sup>a</sup>	0,55 <sup>a</sup>	8,06 <sup>b</sup>	2,06 <sup>b</sup>	11,22 <sup>b</sup>
	0,5	0,10 <sup>b</sup>	3,01 <sup>c</sup>	1,62 <sup>ab</sup>	0,53 <sup>a</sup>	7,44 <sup>c</sup>	0,78 <sup>c</sup>	7,17 <sup>d</sup>
	1,0	0,10 <sup>b</sup>	2,63 <sup>d</sup>	1,61 <sup>ab</sup>	0,53 <sup>a</sup>	7,22 <sup>c</sup>	0,43 <sup>d</sup>	6,72 <sup>d</sup>
LSD 0,05	0,003	0,21	0,07	0,08	0,57	0,16	0,55	
CV%	1,8	4,5	2,6	8,0	4,7	9,1	5,0	

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

Kết quả nghiên cứu ở giai đoạn dưỡng chồi cho thấy, chồi có nguồn gốc từ chồi ngọn phù hợp nhất khi dưỡng ở môi trường MS + 30 g/l sucrose + 5% nước dừa + 6,5 g/l agar. Môi trường dưỡng chồi phù hợp nhất với chồi có nguồn gốc từ đốt thân là MS + 30 g/l sucrose + 10% nước dừa + 6,5 g/l agar.

### 3.3. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Ảnh hưởng của NAA, than hoạt tính (AC) đến khả năng ra rễ của giống Dạ yến thảo kép đen:

Giai đoạn ra rễ cho chồi là giai đoạn cuối cùng trong quy trình nuôi cấy mô. Ở giai đoạn này, các chất nhóm auxin và than hoạt tính thường được sử dụng để kích thích sự hình thành rễ của chồi. Than hoạt tính có mạng lưới các lỗ với bề mặt bên trong rất lớn, có thể hấp thụ được nhiều chất độc hại được bài tiết ra môi trường trong quá trình nuôi cấy và kích thích sự hình thành rễ (Martineau & cs., 1981; Thomas & Dennis, 2008). Với mục đích trên, NAA và than hoạt tính (AC) được sử dụng ở giai đoạn

này để nghiên cứu ảnh hưởng đến sự ra rễ của chồi *in vitro* Dạ yến thảo kép đen.

Số liệu ở bảng 4 cho thấy: trong môi trường không bổ sung NAA hay AC, chồi *in vitro* của giống Dạ yến thảo kép đen có tạo rễ. Khi bổ sung NAA với hàm lượng từ 0,1-0,5 mg/l vào môi trường thì chồi *in vitro* không tạo rễ. Điều này chứng tỏ NAA nội sinh tạo ra ở đỉnh chồi đã đủ để kích thích sự hình thành rễ, do đó bổ sung thêm NAA vào môi trường nuôi cấy làm tổng hàm lượng NAA tăng cao dẫn đến ức chế sự hình thành rễ và có hiện tượng tạo mô sẹo ở gốc chồi tiếp xúc với môi trường. Nghiên cứu trên giống Dạ yến thảo hoa hồng sọc tím của Bùi Thị Cúc & cs. (2017) và giống Dạ yến thảo đơn hoa tím của Phạm Thị Huyền Trang & cs. (2024) cũng cho kết quả tương tự. Thật vậy, ở giống Dạ yến thảo hồng sọc tím, khi tăng hàm lượng NAA trong môi trường ra rễ lên 0,2-0,3 mg/l thì số rễ và chiều dài rễ giảm (Bùi Thị Cúc & cs., 2017). Còn giống Dạ yến thảo đơn hoa tím, khi bổ sung 0,3-0,5 mg/l NAA vào môi trường ra rễ thì các chồi bị ức chế, không tạo rễ (Phạm Thị Huyền Trang & cs., 2024).

**Bảng 5. Khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây sau khi ra ngôi của giống Dạ yến thảo kép đen**

Thời gian	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá (Lá/cây)
Sau khi ra ngôi 1 tuần	100,00	4,01 ± 0,32	10,15 ± 1,07
Sau khi ra ngôi 2 tuần	83,04	4,87 ± 0,37	12,25 ± 1,01
Sau khi ra ngôi 4 tuần	75,00	7,83 ± 0,43	16,55 ± 1,05



(a)



(b)



(c)



(d)

Ghi chú: a: Hình thái hoa của giống Dạ yến thảo kép đen 'Midnight Gold', b: Giai đoạn tái sinh chồi, c: Giai đoạn dưỡng chồi, d: Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh.

**Hình 1. Hình thái hoa và các giai đoạn tái sinh *in vitro* của giống Dạ yến thảo kép đen**

Bảng 4 cũng cho thấy khi bổ sung 0,1 g/l AC vào môi trường nuôi cấy thì các đặc điểm sinh trưởng ở cây *in vitro* của giống Dạ yến thảo kép đen tăng vượt trội. Tuy nhiên, khi tăng hàm lượng AC lên 0,3-1,0 g/l thì các chỉ tiêu chiều cao cây, số lá, chiều dài rễ và số rễ lại giảm mạnh. Như vậy, AC ở hàm lượng thấp kích thích khả năng sinh trưởng và ra rễ của chồi, nhưng ở hàm lượng AC cao gây ức chế sự hình thành rễ. Theo Thomas & Dennis (2008) và Martineau & cs. (1981) ngoài khả năng hấp thụ các chất, than hoạt tính còn có khả năng kích thích ra rễ và thúc đẩy quá trình sinh trưởng của chồi. Do đó, ở hàm lượng thấp (0,1 g/l) than hoạt tính chỉ hấp thụ một phần các chất, kích thích ra rễ và sự sinh trưởng của chồi. Tuy nhiên, ở hàm lượng cao, than hoạt tính sẽ hấp thụ một lượng đáng kể NAA nội sinh cùng với chất dinh dưỡng, các vitamin, ion kim loại khiến cho quá trình sinh trưởng và ra rễ của chồi bị ức chế (Martineau & cs., 1981).

Như vậy, môi trường bổ sung 0,1 g/l AC là phù hợp nhất cho giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh của giống Dạ yến thảo kép đen 'Midnight Gold', với đường kính thân đạt 0,11cm, chiều cao cây đạt 3,58cm, số lá đạt 9,06 lá/cây, với chiều dài rễ là 2,38cm, số rễ đạt 15,17 rễ/cây đều cao nhất, sai khác có ý nghĩa thống kê với các công thức còn lại. Nghiên cứu của Phạm Thị Huyền Trang & cs. (2024) cũng cho kết quả tương tự. Còn nghiên cứu của Võ Thanh Phúc & cs. (2023) trên giống Dạ yến thảo đơn màu hồng phấn, lại cho kết quả môi trường ra rễ bổ sung 0,5 g/l AC là phù hợp với 100% chồi tạo rễ và 13,7 rễ/cây sau 21 ngày nuôi cấy. Như vậy, các giống Dạ yến thảo khác nhau phù hợp với các hàm lượng AC khác nhau bổ sung vào môi trường ra rễ.

### 3.4. Giai đoạn thích nghi ngoài vườn ươm

Khả năng thích nghi và sinh trưởng của giống Dạ yến thảo kép đen ở giai đoạn ra ngôi ngoài vườn ươm:

Đưa cây con từ môi trường *in vitro* ra môi trường tự nhiên là giai đoạn cuối cùng của quá trình nhân giống *in vitro* được gọi là giai đoạn huấn luyện cây con. Ở giai đoạn này, cây con trong phòng thí nghiệm được đem ra trồng trên giá thể 100% peatmoss trong nhà lưới có mái

che, phun sương giữ ẩm để thích nghi dần dần với điều kiện *ex vitro*. Kết quả đánh giá khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây con của giống Dạ yến thảo kép đen trong 4 tuần sau khi ra ngôi được thống kê ở bảng 5.

Kết quả từ bảng 5 cho thấy: cây *in vitro* của giống Dạ yến thảo kép đen thích nghi tốt với điều kiện nhà lưới, với tỷ lệ sống đạt 100% sau 1 tuần ra ngôi. Sau 4 tuần ra ngôi tỷ lệ sống đạt 75% với cây con có chiều cao 7,83cm, số lá đạt 16,55 lá/cây, tăng trưởng 6,4 lá/cây so với khi ra ngôi 1 tuần. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Habas & cs. (2019) trên cây con Dạ yến thảo *in vitro* thích nghi thành công khi trồng trong chậu chứa giá thể peatmoss trong điều kiện phòng thí nghiệm với tỷ lệ sống đạt 70%. Theo Habas & cs. (2019) thì khả năng thích nghi của cây giống ở giai đoạn huấn luyện chúng tỏ cây con *in vitro* có chất lượng tốt, khỏe mạnh trước khi được đưa ra ngôi.

## 4. KẾT LUẬN

Quy trình tái sinh *in vitro* từ mô lá phù hợp cho giống Dạ yến thảo kép đen 'Midnight Gold' như sau: Lá xanh, vô trùng của giống Dạ yến thảo kép đen sau khi khử trùng bằng  $HgCl_2$  0,1% trong 10 phút được cắt thành các mảnh  $0,5 \times 0,5$ cm và cấy vào môi trường MS + 1,0 mg/l BA + 30 g/l sucrose + 6,5 g/l agar để tạo mô sẹo và tái sinh chồi. Đoạn chồi ngọn tái sinh từ mô lá, dài 1,3-1,5cm được cấy vào môi trường MS + 30 g/l sucrose + 5% nước dừa + 6,5 g/l agar để dưỡng chồi. Còn đoạn thân mang một mắt ngủ tái sinh từ mô lá được cấy vào môi trường MS + 30 g/l sucrose + 10% nước dừa + 6,5 g/l agar để dưỡng chồi. Chồi *in vitro* sau giai đoạn dưỡng chồi dài 2cm được cấy vào môi trường MS + 30 g/l sucrose + 0,1 g/l AC + 6,5 g/l agar để tạo cây hoàn chỉnh. Cây con *in vitro* được trồng trên giá thể peatmoss thích nghi tốt sau 4 tuần ra ngôi với tỷ lệ sống đạt 75%, chiều cao cây đạt 7,83cm, số lá đạt 16,55 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.
- 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.
- Habas R.R., Turker M. & Ozdemir F.A. (2019). *In vitro* multiple shoot regeneration from *Petunia hybrida*. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*. 7(10): 1554-1560.
- Hassan A.Q., Anas A.R. & Sami Y. (2010). *In vitro* regeneration and somaclonal variation *Petunia hybrida*. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 18 (1): 71-81.
- Lê Bảo Phúc, Võ Trang Anh Thư & Võ Thanh Phúc (2022). Ảnh hưởng của Nano bạc lên sự phát sinh chồi và ra rễ của cây Dạ yến thảo (*Petunia Hybrida* L.). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Đà Nẵng*. 20(11.1): 13-18.
- Martineau B., Hanson M.R. & Ausubel F.M. (1981). Effect of charcoal and hormones on anther culture of *Petunia* and *Nicotiana*. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*. 102(2): 109-116.
- Murashige T. & Skoog F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiology*. 15: 473-497.
- Ndagijimana V., Kahia J., Asimwe T., Sallah P.Y., Waweru B., Mushimiyimana I., Ndirigwe J., Kirimi S., Shumbusha D., Njenga P., Kouassi M., & Koffi E. (2014). In vitro effects of gibberellic acid and sucrose concentration on micropropagation of two elite sweet potato cultivars in Rwanda. *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research*. 5(1):1-6.
- Nguyễn Tiến Long, Lê Thị Thu Hằng, Trần Thị Triêu 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.). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*. 63 (7): 53-56.
- Nowak B., Miczyński K. & Hudy L. (2004). Sugar uptake and utilisation during adventitious bud differentiation on *in vitro* leaf explants of 'Wegierka Zwyczajna' Plum (*Prunus domestica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 76: 255-260.
- Phạm Hoàng Hộ (2000). *Cây cỏ Việt nam*. Tập 2. Nhà xuất bản Trẻ. Tr. 769.
- Phạm Thị Huyền Trang, Nguyễn Thị Thúy Hạnh & Phùng Thị Thu Hà (2024). Nghiên cứu nhân *in vitro* Dạ yến thảo hoa tím (*Petunia hybrida* Hort.). *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 22(1): 1-9.
- Phan Xuân Huyền & Nguyễn Thị Phương Hoàng (2017). Nghiên cứu tái sinh chồi và nuôi trồng cây Lan gấm (*Anoectochilus formosanus* Hayata). *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 15(3): 515-524.
- Thomas & Dennis T. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture", *Biotechnol. Adva*. 26: 618-631.
- Võ Thanh Phúc, Nguyễn Hoàng Huỳnh & Võ Thanh Truyền (2023). Thiết lập qui trình vi nhân giống hiệu quả cây Dạ yến thảo (*Petunia hybrida* Hort. ex Vilmor.). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Đà Nẵng*. 21(9.1): 72-77.
- 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.