

EFFECTS OF COCONUT WATER, AGAR AND SUCROSE ON VITRIFICATION, REGENERATION AND GENETIC STABILITY OF *IN VITRO* CARNATIONS

La Viet Hong*, Nguyen Van Dinh

Hanoi Pedagogical University 2

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 10/01/2022	Vitrification is a severe common problem, causing a reduction in the quality of in vitro carnation (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.), leading to reduced process efficiency of production. In this study, coconut water, sucrose and agar were added to the medium to regenerate shoots <i>in vitro</i> and reduce the rate of vitrification. Evaluation of the genetic stability of regenerated plants was also performed. The results showed that MS medium, 7 g.L ⁻¹ agar, 30 g.L ⁻¹ sucrose supplemented with 5% coconut water (v/v) were suitable for the regeneration of Breezer, Cerise rosy barbara, Plantom and Red barbara. The shoot number per explants was 5.75; 6.00; 4.25 and 5.00, respectively. The shoot height was 6.25; 6.38; 8.00; 8.50 (cm), respectively. The leaf number per shoot was 11.75; 12.50; 12.00; 11.75, respectively. The same components of the medium by adding 10% (v/v) coconut water was suitable for Regatta varieties. The shoot number per explants, the shoot height, and the leaf number per shoot were 5.75; 8.50; 11.25, respectively. MS medium, 7 g.L ⁻¹ agar supplemented with 35g sucrose or MS medium, 30 g.L ⁻¹ sucrose supplemented with 8 g.L ⁻¹ agar were suitable to reduce the vitrification rate of five commercial carnation varieties, while agar 7 g.L ⁻¹ or sucrose 30 g.L ⁻¹ were suitable for in vitro shoot regeneration. By using UBC808 marker for ISSR-PCR, 5'-G-(AG) _n -C-3', it demonstrated that the newly regenerated plant was genetically stable as the mother plant.
Revised: 09/3/2022	
Published: 04/4/2022	
KEYWORDS	
Agar	
Carnation	
Coconut water	
Genetic stability	
Sucrose	
Vitrification	

ẢNH HƯỞNG CỦA NƯỚC DỪA, AGAR VÀ SUCROSE ĐẾN THUỶ TINH HOÁ, SỰ TÁI SINH VÀ SỰ ỔN ĐỊNH DI TRUYỀN CỦA CÂY CẨM CHƯỞNG *IN VITRO*

La Việt Hồng*, Nguyễn Văn Đình

Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 10/01/2022	Thuỷ tinh hoá là một vấn đề thường xảy ra, làm giảm chất lượng cây cẩm chướng (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.) <i>in vitro</i> , dẫn tới giảm hiệu quả quy trình sản xuất. Trong nghiên cứu này, nước dừa, sucrose và agar được thêm vào hàm lượng bổ sung vào môi trường nhằm tái sinh chồi <i>in vitro</i> và làm giảm tỷ lệ thuỷ tinh hoá. Việc đánh giá sự ổn định di truyền của cây tái sinh cũng được thực hiện. Kết quả cho thấy, môi trường MS, agar 7 g.L ⁻¹ , sucrose 30 g.L ⁻¹ bổ sung nước dừa 5% (v/v) là thích hợp để tái sinh các giống trắng viền đỏ, hồng cánh sen, đỏ nhung và đỏ chùm, số chồi/mẫu lần lượt là 5,75; 6,00; 4,25 và 5,00. Chiều cao chồi lần lượt là 6,25; 6,38; 8,00; 8,50 (cm); Số lá/chồi tương ứng là 11,75; 12,50; 12,00; 11,75. Trong khi môi trường tương tự nhưng bổ sung nước dừa 10% (v/v) là phù hợp cho giống vàng chanh. Số chồi/mẫu, chiều cao chồi và số lá/chồi lần lượt là 5,75; 8,50; 11,25. Môi trường MS, agar 7 g.L ⁻¹ bổ sung sucrose 35g hoặc MS, sucrose 30 g.L ⁻¹ bổ sung agar 8 g.L ⁻¹ thích hợp để giảm tỷ lệ thuỷ tinh hoá ở năm giống cẩm chướng; trong khi đó, agar 7 g.L ⁻¹ hoặc sucrose 30 g.L ⁻¹ là phù hợp để tái sinh chồi <i>in vitro</i> . Bằng chỉ thị UBC 808, 5'-G-(AG) _n -C-3', chứng minh cây tái sinh ổn định di truyền như cây mẹ.
Ngày hoàn thiện: 09/3/2022	
Ngày đăng: 04/4/2022	
TỪ KHÓA	
Agar	
Cẩm chướng	
Nước dừa	
Ổn định di truyền	
Sucrose	
Thuỷ tinh hoá	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.5448>

* Corresponding author. Email: laviethong@hpu2.edu.vn

1. Giới thiệu

Cây hoa cẩm chướng cắt cành (*Dianthus caryophyllus* L.) thuộc họ Cẩm chướng gồm 88 chi với 1750 loài [1]. Cây hoa cẩm chướng (*Dianthus caryophyllus* L.) được trồng ở Việt Nam từ đầu thế kỷ XX ở những nơi có khí hậu mát mẻ như Sa Pa (Lào Cai), Đà Lạt (Lâm Đồng). Hiện nay, hầu hết các giống cẩm chướng hiện có ở nước ta đều được nhập nội từ Hà Lan, Pháp, Đức, Ý và Trung Quốc [2]. Để cung cấp cây giống cẩm chướng cho sản xuất, phương pháp nuôi cấy mô là một lựa chọn ưu tiên. Vật liệu được sử dụng để tái sinh cây cấy mô cũng rất đa dạng như lá, đốt thân chứa mắt ngủ và đốt thân không chứa mắt ngủ [1], tái sinh từ đỉnh chồi và đốt thân, đồng thời đánh giá khả năng sinh trưởng ngoài đồng ruộng [3]. Để phát sinh chồi từ các vật liệu như lá, đốt thân, các nghiên cứu thường sẽ tái sinh thông qua callus [1], [3]. Cách tái sinh này thường tạo cây con không đồng nhất di truyền so với cây mẹ ban đầu.

Hiện tượng thủy tinh hoá là một vấn đề nghiêm trọng thường gặp phải ở cây cẩm chướng. Cây thủy tinh hoá (cây bị mọng nước) thường có hình thái, sinh lý và giải phẫu bất thường, dẫn đến cây *in vitro* khó sống sót khi được chuyển rèn luyện ra ngoài điều kiện tự nhiên [4]. Bình nuôi cấy không hoặc ít khuếch tán khí ra môi trường xung quanh là nguyên nhân dẫn đến sự hoại tử, hiện tượng thủy tinh hóa và hình thái bất thường khác của thực vật nuôi cấy *in vitro* [5]. Hiện tượng thủy tinh hoá là nút thắt đối với quá trình nuôi cấy *in vitro* [6]. Loại (bản chất) và hàm lượng agar trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến hiện tượng thủy tinh hóa. Việc cải tiến thành phần môi trường cũng có thể làm giảm hiện tượng thủy tinh hóa. Điều chỉnh tỷ lệ NO_3^- cao hơn so với NH_4^+ sẽ ngăn chặn thủy tinh hóa trong suốt quá trình nuôi cấy cẩm chướng *in vitro* [7]. Bản chất loại cytokin được sử dụng cũng ảnh hưởng đến tỷ lệ mẫu bị thủy tinh hoá ở cây cẩm chướng [8]. Ngoài ra, việc bổ sung nước cốt dừa cũng làm giảm hiện tượng thủy tinh hoá ở cây mùi tàu (*Eryngium Foetidum* L.) [9].

Xuất phát từ những vấn đề trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm hoàn thiện quy trình nhân nhanh *in vitro* năm giống hoa cẩm chướng thương mại loại cắt cành dưới ảnh hưởng của nước dừa được sử dụng như một hỗn hợp chất điều hoà sinh trưởng tự nhiên. Nghiên cứu cũng tiến hành đánh giá ảnh hưởng của nồng độ agar, đường sucrose tới tỷ lệ thủy tinh hoá, tái sinh chồi *in vitro* khi mẫu được nuôi cấy trên môi trường chứa 6-benzyl amino purin. Ngoài ra, đánh giá sự ổn định di truyền cũng được tiến hành bằng kỹ thuật PCR-ISSR.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Mẫu thực vật: 05 giống cẩm chướng thương mại được lưu giữ tại Phòng Sinh lý học thực vật, Khoa Sinh - KTN, trường ĐHSP Hà Nội 2 gồm: trắng viên đỏ-TVĐ (Breezer), hồng cánh sen-HCS (Cerise rosy barbara), vàng chanh-VC (Regatta), đỏ nhung-ĐN (Plantom) và đỏ chùm-ĐC (Red barbara).

- Môi trường nuôi cấy là MS cơ bản (Murashige và Skoog) (pH 5,8) [10], chứa nguyên tố đa lượng, vi lượng, vitamin (Xilong, Trung Quốc). Đường sucrose (Công ty Mía đường I, Việt Nam), agar (Công ty TNHH Hải Long, Việt Nam). Các chất điều hoà sinh trưởng 6-benzyl amino purin (BAP) và α -naphthalene acetic acid (NAA) (Dulcheffa, Hà Lan). Nước dừa (ND) được thu mua tại Xuân Hoà, Phúc Yên, Vĩnh Phúc.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Ảnh hưởng của nước dừa đến tỷ lệ thủy tinh hoá và tái sinh chồi *in vitro*

Mẫu đốt thân có chiều dài từ 2-3 (cm) được nuôi cấy trên môi trường MS + 30 g.L⁻¹ đường sucrose + 7 g.L⁻¹ agar có bổ sung nước dừa 0; 5; 10; 15; 20 (% v/v), mỗi môi trường (công thức - CT) gồm 30 mẫu. Xác định các chỉ tiêu sau 5 tuần nuôi cấy: số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), số lá/chồi, tỷ lệ thủy tinh hóa (%).

2.2.2. Ảnh hưởng của agar đến tỷ lệ thủy tinh hoá và tái sinh chồi *in vitro*

Mẫu đốt thân có chiều dài từ 2-3 (cm) được nuôi cấy trên môi trường MS + 30 g.L⁻¹ đường sucrose + BAP 0,1 mg.L⁻¹ + agar với các nồng độ: 6, 7, 8 (g.L⁻¹), mỗi công thức (CT) gồm 30 mẫu. Xác định các chỉ tiêu sau 5 tuần nuôi cấy: số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), số lá/chồi, tỷ lệ thủy tinh hóa (%).

2.2.3. Ảnh hưởng của sucrose đến tỷ lệ thủy tinh hoá và tái sinh chồi *in vitro*

Mẫu đốt thân có chiều dài từ 2-3 (cm) được nuôi cấy trên MS + 7g.L⁻¹ agar + BAP 0,1 mg.L⁻¹ + sucrose với các nồng độ 25, 30, 35 (g.L⁻¹), mỗi công thức (CT) gồm 30 mẫu. Xác định các chỉ tiêu sau 5 tuần nuôi cấy: số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), số lá/chồi, tỷ lệ thủy tinh hóa (%).

2.2.4. Đánh giá sự ổn định di truyền của các chồi cảm chương tái sinh *in vitro*

DNA tổng số từ lá *in vitro*, cây mẹ ngoài vườn ươm và mẫu bị thủy tinh hoá được tách chiết bằng CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) [11]. DNA này được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR với mỗi ISSR UBC 808 (5'→3': G-(AG)₇-C) với thể tích 20μl bao gồm nước cất vô trùng, Master Mix 2X, primer ISSR và DNA template, chu trình nhiệt được thực hiện trên máy PCR GeneAmp PCR System 2700 như sau: 5 phút ở 94°C, 40 chu kỳ gồm 94°C/30 giây, 45°C/30 giây và 72°C/45 giây, cuối cùng là hoàn tất chuỗi ở 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 0,8% (w/v) trong đệm TAE 1X, hiện bằng dưới đèn UV. Các đoạn DNA khuếch đại được ghi nhận và phân tích.

2.2.5. Phân tích thống kê

Số liệu thực nghiệm được xử lý theo các tham số thống kê. Sự sai khác giữa các giá trị trung bình được kiểm tra bằng thuật toán LSD của Fisher với $\alpha = 0,05$ trên phần mềm Excel 2010 [12].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của nước dừa

Hiện tượng thủy tinh hóa ở cây cảm chương có rất nhiều nguyên nhân liên quan đến nồng độ và bản chất của yếu tố làm đông môi trường và chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Trong nghiên cứu này, môi trường nuôi cấy được bổ sung nước dừa với các nồng độ khác nhau để theo dõi sự sinh trưởng của năm giống Cảm chương *in vitro*. Kết quả nghiên cứu thu được thể hiện ở bảng 1 và hình 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nước dừa đến tỷ lệ thủy hoá và tái sinh chồi *in vitro* của năm giống cảm chương

Chỉ tiêu	Nước dừa (% v/v)	TVĐ	HCS	VC	ĐN	ĐC
Tỷ lệ thủy tinh hóa (%)	0	8,0%	4,5%	5,0%	6,0%	3,0%
	5	0%	0%	0%	0%	0%
	10	10,0%	14,2%	12,5%	20,0%	0%
	15	40,0%	55,5%	62,5%	50,0%	41,6%
	20	100%	75,0%	100%	100%	90,9%
Số chồi/mẫu	0	3,75 ^{bc}	3,25 ^b	3,00 ^{bc}	3,25 ^{ab}	2,50 ^b
	5	5,75 ^a	6,00 ^a	3,25 ^{bc}	4,25 ^a	5,00 ^a
	10	4,75 ^{ab}	5,50 ^a	5,75 ^a	4,00 ^{ab}	4,50 ^{ab}
	15	3,50 ^{bc}	3,75 ^b	3,75 ^b	2,75 ^b	4,00 ^{abc}
	20	3,00 ^c	4,00 ^b	2,00 ^c	2,75 ^b	3,00 ^{bc}
	LSD ₀₅	1,46	1,81	1,24	1,29	1,45
Chiều cao chồi (cm)	0	5,75 ^{bc}	6,75 ^{ab}	5,25 ^{bc}	3,00 ^c	8,00 ^a
	5	6,25 ^{ab}	6,38 ^{ab}	8,00 ^a	4,75 ^a	8,50 ^a
	10	6,75 ^a	7,25 ^a	8,50 ^a	4,00 ^b	6,50 ^b
	15	5,25 ^c	6,35 ^{ab}	5,75 ^b	3,00 ^c	5,93 ^{bc}
	20	3,50 ^d	5,75 ^b	4,5 ^c	2,50 ^c	5,25 ^c

Chỉ tiêu	Nước dừa (% v/v)	TVĐ	HCS	VC	ĐN	ĐC
	<i>LSD_{.05}</i>	0,77	1,08	0,91	0,51	1,15
Số lá/chồi	0	13,50 ^a	10,25 ^{bc}	10,00 ^{ab}	8,75 ^{bc}	10,5 ^{ab}
	5	11,75 ^{ab}	12,50 ^{ab}	12,00 ^a	11,25 ^a	11,75 ^a
	10	11,25 ^{ab}	14,25 ^a	11,25 ^{ab}	9,50 ^b	10,25 ^{ab}
	15	11,00 ^b	10,00 ^{bc}	9,25 ^{ab}	7,25 ^c	9,00 ^b
	20	6,75 ^c	8,00 ^c	8,50 ^b	7,00 ^c	6,50 ^c
	<i>LSD_{.05}</i>	2,30	3,02	2,81	2,10	2,31

Ghi chú: * trong cùng 1 cột, ký tự theo sau khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $\alpha=0,05$



Hình 1. Ảnh hưởng của nước dừa đến sinh trưởng của năm giống Cẩm chương in vitro
(a) ĐN nuôi cấy ở môi trường nước dừa 0% (đối chứng); (b, c, d, e) lần lượt là các giống ĐC, HCS, TVĐ và ĐN nuôi cấy ở môi trường nước dừa 5%; (f) giống VC nuôi cấy ở môi trường nước dừa 10%

Tỷ lệ thủy tinh hóa cao nhất chịu ảnh hưởng của nước dừa bổ sung vào môi trường nuôi cấy, khi nồng độ nước dừa càng tăng thì tỷ lệ thủy tinh hoá càng cao, lên đến 100% ở các giống TVĐ, VC, ĐN; tỷ lệ thủy tinh hoá ở hai giống còn lại ở mức khá cao, cụ thể là 75,0% ở giống HCS và 90,9% ở giống ĐC. Ở nồng độ nước dừa 5%, không gặp phải hiện tượng thủy tinh hoá ở tất cả năm giống cẩm chương.

Đối với quá trình tái sinh chồi, việc bổ sung nước dừa có tác dụng rõ rệt đến chỉ tiêu số chồi/mẫu, chiều cao chồi và số lá/chồi. Ở hầu hết năm giống, nồng độ nước dừa 5% cho số chồi/mẫu cao nhất, cụ thể số chồi/mẫu của TVĐ, HCS, ĐN và ĐC lần lượt là 5,75; 6,00; 4,25 và 5,00. Riêng giống VC có số chồi/mẫu cao nhất (5,75) ở công thức bổ sung 10% nước dừa. Về chiều cao chồi, sự tác động của nước dừa rất khác nhau giữa các giống cẩm chương, có thể chia thành ba nhóm, nhóm 1 gồm TVĐ và VC, nồng độ nước dừa thích hợp là 5 và 10% cho kết quả tốt, chiều cao chồi đạt tương ứng 6,25-6,75 (cm) và 8,00-8,50 (cm). Nhóm 2 gồm 2 giống ĐN và ĐC có chiều cao chồi tốt nhất ở nồng độ nước dừa 5%, chiều cao đạt lần lượt là 4,75 và 8,50 (cm). Nhóm 3 gồm 1 giống HCS, cụ thể không có sự khác biệt rõ rệt về chiều cao giữa các nồng độ 5, 10 và 15 (%) và đối chứng, chỉ tiêu này bị giảm khi nước dừa bổ sung 20%. Về số lá/chồi dưới ảnh hưởng của nước dừa cũng xảy ra ở mức độ khác nhau giữa các giống, ở nồng độ 5 và 10 (%) cho số lá/chồi tương đương nhau và cao hơn so với nồng độ 15 và 20 (%) ở các giống TVĐ, HCS và ĐC, ở giống ĐN, chỉ nước dừa nồng độ 5% là phù hợp, trong khi đó ở giống VC thì không có sự khác biệt giữa các nồng độ nước dừa bổ sung.

Như vậy, khi tăng nồng độ ND bổ sung vào môi trường thì tỷ lệ mẫu bị thủy tinh hóa cũng tăng, môi trường phù hợp để nhân nhanh các giống: TVĐ, HCS, ĐN và ĐC là ND 5%, riêng với giống VC là ND 10%, kết quả nghiên cứu này tương tự với kết quả trong công trình nghiên cứu của Chandrika và cộng sự (2015) [9].

3.2. Ảnh hưởng của agar

Độ ẩm tương đối và thể nước cao là các yếu tố quan trọng liên quan tới hiện tượng thủy tinh hóa trong nuôi cấy [13]. Trong nghiên cứu này, tiến hành bổ sung agar vào môi trường nuôi cấy

với hàm lượng khác nhau sau đó quan sát sự sinh trưởng của năm giống cảm chương, chúng tôi thu được kết quả ở bảng 2 và hình 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của agar đến tỷ lệ thủy hoá và tái sinh chồi *in vitro* của năm giống cảm chương

Chỉ tiêu	Agar (g.L^{-1}) bổ sung	TVĐ	HCS	VC	ĐN	ĐC
Tỷ lệ thủy tinh hóa (%)	6	10%	6,25%	5,56%	13,33%	21,43%
	7	8,0%	4,5%	5,0%	10%	16,67%
	8	0%	0%	0%	6,0%	3,0%
Số chồi/ mẫu	6	1,75 ^b	2,50 ^b	1,50 ^b	1,50 ^b	2,25 ^{ab}
	7	3,75 ^a	3,75 ^a	3,00 ^a	3,25 ^a	2,50 ^a
	8	3,25 ^a	2,00 ^b	2,00 ^b	2,00 ^b	1,50 ^b
	<i>LSD</i> _{.05}	1,33	1,032	0,92	1,03	0,88
Chiều cao chồi (cm)	6	4,50 ^b	3,50 ^b	4,75 ^a	2,00 ^b	4,75 ^b
	7	6,25 ^a	6,75 ^a	5,25 ^a	3,00 ^a	8,00 ^a
	8	3,75 ^b	4,00 ^b	4,00 ^b	2,25 ^b	3,25 ^c
	<i>LSD</i> _{.05}	0,84	1,03	0,65	0,46	1,46
Số lá/ chồi	6	11,00 ^b	7,00 ^b	9,75 ^a	7,25 ^b	6,50 ^b
	7	13,50 ^a	10,25 ^a	10,00 ^a	8,75 ^a	10,50 ^a
	8	10,50 ^b	7,75 ^b	9,50 ^a	8,00 ^{ab}	7,75 ^{ab}
	<i>LSD</i> _{.05}	1,51	2,47	2,81	1,25	3,31

Ghi chú: trong cùng 1 cột, ký tự theo sau khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $\alpha=0,05$



Hình 2. Ảnh hưởng của hàm lượng agar đến sự tái sinh chồi của cây cảm chương *in vitro* (a, b) lần lượt là giống ĐC và TVĐ nuôi cấy ở môi trường agar 6g.L^{-1} ; (c) VC nuôi cấy ở môi trường agar 7g.L^{-1} ; (d) là giống ĐC nuôi cấy ở môi trường agar 8g.L^{-1}

Hàm lượng agar bổ sung vào môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ mẫu bị thủy tinh hoá, nồng độ agar càng cao thì tỷ lệ mẫu bị thủy tinh hoá càng giảm, cụ thể ở nồng độ agar 8g.L^{-1} , tỷ lệ thủy tinh hoá là 0% ở các giống TVĐ, HCS và VC. Trong khi đó, tỷ lệ thủy tinh hoá ở 2 giống ĐN và ĐC khá thấp, lần lượt là 6 và 3 (%). Hiện tượng thủy tinh hoá thường do độ ẩm tương đối cao trong bình nuôi hoặc do hàm lượng agar thấp [14]. Tăng hàm lượng agar lên 8g.L^{-1} , có thể đã làm thay đổi về áp suất thẩm thấu của môi trường nuôi cấy, do đó giảm hiện tượng này. Ở hầu hết các giống, hàm lượng agar 7g.L^{-1} là phù hợp với quá trình tái sinh chồi *in vitro*, số chồi/mẫu dao động từ 2,50 (ở giống ĐC) đến 3,75 (ở giống TVĐ và HCS). Chiều cao chồi cũng chịu ảnh hưởng của agar tương tự như chỉ tiêu số chồi/mẫu, cụ thể ở 4 giống TVĐ, HCS, ĐN và ĐC thì nồng độ agar 7g.L^{-1} là phù hợp, trong khi đó chỉ tiêu này ở giống VC, nồng độ 6 và 7g.L^{-1} cho kết quả tương đương nhau và cao hơn so với nồng độ agar 8g.L^{-1} . Về chỉ tiêu số lá/chồi, nồng độ agar 7g.L^{-1} là phù hợp với 2 giống TVĐ và HCS, số lá/chồi đạt lần lượt là 13,50 và 10,25; trong khi đó ở 2 giống ĐN và ĐC thì nồng độ agar 7 và 8g.L^{-1} cho kết quả tương đương nhau và cao hơn so với công thức còn lại; riêng giống VC, số lá/chồi không có sự khác

biệt ở các công thức. Như vậy, môi trường bổ sung agar 7 g.L⁻¹ là phù hợp để tái sinh chồi hiệu quả và tỷ lệ thủy tinh hoá thấp ở các giống TVĐ, HCS, VC và ĐN. Riêng giống ĐC nên sử dụng agar với hàm lượng 8g.L⁻¹.

3.3. Ảnh hưởng của sucrose đến sinh trưởng của cây Cẩm chương *in vitro*

Ánh sáng và đường là các yếu tố cơ bản của sự trao đổi chất thực vật và có vai trò quan trọng đến tình trạng của cây nuôi cấy *in vitro* [15]. Hàm lượng đường thấp trong nuôi cấy có thể làm tăng độ ẩm tương đối trong bình nuôi, dẫn đến tăng tỷ lệ mẫu bị thủy tinh hoá [14]. Đường sucrose đã được bổ sung với nồng độ khác nhau, kết quả được thể hiện ở bảng 3 và hình 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của sucrose đến tỷ lệ thủy hoá và tái sinh chồi *in vitro* của năm giống cẩm chương

Chỉ tiêu	Sucrose (g.L ⁻¹)	TVĐ	HCS	VC	ĐN	ĐC
Tỷ lệ thủy tinh hóa (%)	25	30%	6,67%	25%	0%	14,29%
	30	7,14%	0%	9,09%	0%	10%
	35	0%	0%	0%	0%	0%
Số chồi/ mẫu	25	2,00 ^b	2,50 ^b	2,25 ^a	2,25 ^{ab}	3,25 ^a
	30	3,75 ^a	3,00 ^{ab}	3,00 ^a	3,25 ^a	3,50 ^a
	35	3,00 ^a	3,75 ^a	1,75 ^a	1,75 ^b	2,50 ^a
	LSD _{.05}	0,88	1,03	1,25	1,33	1,16
Chiều cao chồi	25	4,25 ^b	4,50 ^b	4,00 ^b	2,00 ^b	5,50 ^b
	30	6,25 ^a	6,75 ^a	5,25 ^a	3,00 ^a	8,00 ^a
	35	4,00 ^b	4,25 ^b	5,00 ^a	1,50 ^b	5,75 ^b
	LSD _{.05}	0,65	1,13	0,46	0,53	1,48
Số lá/ chồi	25	11,00 ^b	7,50 ^b	9,50 ^a	6,75 ^b	10,25 ^a
	30	13,50 ^a	10,25 ^a	10,00 ^a	8,75 ^a	10,5 ^a
	35	9,50 ^b	7,25 ^b	9,25 ^a	8,50 ^a	9,00 ^a
	LSD _{.05}	2,13	1,73	3,61	1,55	2,81

Ghi chú: * trong cùng 1 cột, ký tự theo sau khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $\alpha=0,05$



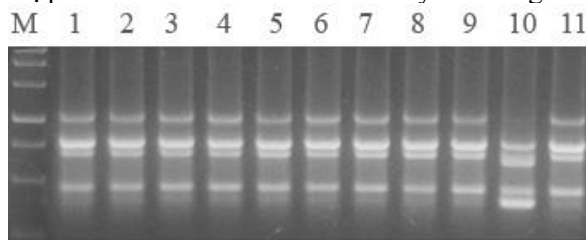
Hình 3. Ảnh hưởng của hàm lượng sucrose đến khả năng tái sinh chồi của cây cẩm chương *in vitro* (a, b, c) lần lượt là giống TVĐ, HCS, VC nuôi cấy ở môi trường sucrose 30.L⁻¹; (d) là ĐN nuôi cấy ở môi trường sucrose 35g.L⁻¹

Tỷ lệ thủy tinh hoá ở cây hoa cẩm chương được nuôi cấy *in vitro* chịu ảnh hưởng rõ rệt bởi nồng độ đường bổ sung và đặc tính của từng giống. Đặc biệt ở giống ĐN, ở cả ba nồng độ đường được nghiên cứu, không xảy ra hiện tượng thủy tinh hoá, trong khi đó ở nồng độ 35 g.L⁻¹, ở cả năm giống gồm TVĐ, HCS, VC, ĐN và ĐC không gặp hiện tượng này. Kết quả này cho thấy, trạng thái vật lý của môi trường nuôi cấy ảnh hưởng rất lớn đến sự tích lũy nước trong cây cẩm chương *in vitro*. Về số chồi/mẫu, nồng độ sucrose 30 g.L⁻¹ và 35 g.L⁻¹ là phù hợp với giống TVĐ và HCS, trong khi ở giống ĐC thì nồng độ thấp hơn 25 g.L⁻¹ và 30 g.L⁻¹ cho kết quả tốt hơn. Đối với 2 giống gồm VC và ĐC thì không có sự khác biệt ở cả ba nồng độ được thử nghiệm. Nồng độ đường 30 g.L⁻¹ và 35 g.L⁻¹ cho số lá/chồi tương đương và cao hơn so với công thức còn lại ở ba giống VC, ĐN và ĐC. Trong khi đó, ở giống TVĐ và HCS, nồng độ sucrose phù hợp là 30 g.L⁻¹.

Như vậy, có thể thấy việc bổ sung nồng độ sucrose 35 g.L^{-1} là phù hợp cho cả 5 giống để hạn chế hiện tượng thủy tinh hoá và tái sinh khá hiệu quả.

3.4. Đánh giá sự ổn định di truyền của cây cẩm chương *in vitro*

Sự ổn định về di truyền giữa các cây tái sinh *in vitro* so với cây mẹ ban đầu là cần thiết cho công tác nhân giống cây trồng. Các chỉ thị phân tử ISSR đã được sử dụng rộng rãi trong phân tích đa dạng di truyền của giống cây dưa chuột [16]. Trong nghiên cứu này, kết quả phân tích hình ảnh điện di sử dụng chỉ thị phân tử ISSR UBC 808 cho thấy các băng rõ nét (hình 4).



Hình 4. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR-ISSR với mồi UBC808

1, 2, 3, 4, 5: chồi TVĐ, HCS, VC, ĐC, ĐN tái sinh trên môi trường chứa nước dừa; 6, 7: chồi TVĐ, HCS tái sinh trên môi trường chứa agar 8 g.L^{-1} ; 8, 9: chồi VC, ĐN tái sinh trên môi trường chứa sucrose 35 g.L^{-1} ; 10: mẫu cây thủy tinh hoá; 11: cây mẹ ngoài vườn ươm; M: marker 1kb

Kết quả cho thấy, chồi cẩm chương được tái sinh *in vitro* trên môi trường nuôi cấy có bổ sung nước dừa, agar, đường sucrose có sự ổn định về di truyền so với cây mẹ ban đầu, số băng đơn hình là 4 trong tổng số 4 band (tỷ lệ băng đơn hình là 100%); ngược lại ở mẫu bị thủy tinh hoá, tổng số băng 5, số băng đơn hình 2 (tỷ lệ băng đơn hình là 40%).

4. Kết luận

Môi trường MS với 30 g.L^{-1} sucrose và 7 g.L^{-1} agar có bổ sung nước dừa với nồng độ 5% là thích hợp cho sự tái sinh *in vitro* của bốn giống cẩm chương: trắng viền đỏ, hồng cánh sen, đỏ nhung và đỏ chùm, thành phần môi trường tương tự nhưng với nước dừa 10% là thích hợp cho giống vàng chanh, thể hiện ở số chồi/mẫu cao và không bị hiện tượng thủy tinh hoá. Môi trường MS, BAP $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, 30 g.L^{-1} sucrose với hàm lượng agar 8g là thích hợp làm giảm tỷ lệ thủy tinh hoá ở cả năm giống cẩm chương *in vitro*. Trong khi đó, thành phần môi trường tương tự nhưng nồng độ agar giảm xuống còn 7 g.L^{-1} là phù hợp với quá trình tái sinh chồi *in vitro* ở cả năm giống nghiên cứu. Môi trường MS, BAP $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, 7 g.L^{-1} agar và sucrose 35g thích hợp làm giảm hiện tượng thủy tinh hoá ở cả năm giống cẩm chương, trong khi hàm lượng sucrose giảm xuống 30 g.L^{-1} là phù hợp để tái sinh chồi *in vitro* ở các giống này. Bằng kỹ thuật ISSR-PCR đã xác nhận đặc điểm di truyền của năm giống cẩm chương tái sinh *in vitro* dưới ảnh hưởng của nước dừa, sucrose hoặc agar là không có sự khác biệt so với cây mẹ ban đầu.

Lời cảm ơn

Công trình được sự hỗ trợ về kinh phí của Dự án sản xuất thử nghiệm Bộ GD&ĐT, mã số: B2017-SP2-13.TN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] M. Arif, A. Rauf, A. D. Khan, M. Rauf, and H. Afrasiab, "High frequency plant regeneration from leaf derived callus of *Dianthus caryophyllus* L.," *American Journal of Plant Sciences*, vol. 5, pp. 2454-2463, 2014.
- [2] H. H. Le, T. K. L. Nguyen, D. T. Le, N. K. Dadlani, X. L. Nguyen, and T. L. T. Pham, *Techniques for the production of some types of flowers*. Vietnam Agricultural Publishing House, 2012.
- [3] M. M. Khatun, M. M. Rahman, and P. K. Roy, "In vitro regeneration and field evaluation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) through shoot tip and node culture," *Journal of applied Science and Technology*, vol. 9, pp. 93-99, 2013.

-
- [4] L. Martinez, R. Visser, and G. -J. De Klerk, "The hyperhydricity syndrome: Waterlogging of plant tissues as a major cause," *Propagation of Ornamental Plants*, vol. 10, pp. 169-175, 2010.
- [5] K. Shetty, O. F. Curtis, R. E. Levin, R. Witkowski, and W. Ang, "Prevention of vitrification associated with *in vitro* shoot culture of Oregano. (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp," *Journal of Plant Physiology*, vol. 147, pp. 447-451, 1995.
- [6] B. N. Hazarika and A. Bora, "Hyperhydricity - a bottleneck to micropropagation of plants," *Acta Hort*, vol. 865, pp. 95-102, 2010.
- [7] S. W. Park, J. H. Jeon, H. S. Kim, Y. M. Park, C. Aswath, and H. Joung, "Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*," *Scientia Horticulturae*, vol. 99, pp. 199-205, 2004.
- [8] M. Kharrazi, H. Nemati, A. Tehranifar, A. Bagheri, and A. R. Sharifi, "*In vitro* culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) focusing on the problem of vitrification," *Journal of Biological and Environmental Sciences*, vol. 5, pp.1-6, 2011.
- [9] R. Chandrika, M. N. Shivakameshwari, and K. J. T. Saraswathi, "Reduction of vitrification in *in vitro* shoot cultures of *Eryngium Foetidum* L. - A potential aromatic and medicinal," *Indian Journal of Plant Sciences*, vol. 4, pp. 52-58, 2015.
- [10] T. Murashige and F. Skoog, "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures," *Physiologia Plantarum*, vol. 15, pp. 473-497, 2006.
- [11] A. Healey, A. Furtado, T. Cooper, and R. Henry, "Protocol: A simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species," *Plant methods*, vol. 10, pp. 21, 2014.
- [12] V. M. Nguyen, V. H. La, and X. P. Ong, *Methods in plant physiology*. Hanoi: Hanoi National University Publishing House, 2013.
- [13] B. Winartoa, M. A. Azizb, A. A. Rashidb, and R. M. Ismail, "Effect of permeable vessel closure and gelling agent on reduction of hyperhydricity in *in vitro* culture of carnation," *Indonesian Journal of Agricultural Science*, vol. 5, pp. 11-19, 2004.
- [14] M. Ziv, "Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants," in *Micropropagation: Technology and Application*, P. C. Debergh and R. H. Zimmerman, Eds., ed Dordrecht: Springer Netherlands, 1991, pp. 45-69.
- [15] A. Eckstein, P. Zięba, and H. Gabryś, "Sugar and light effects on the condition of the photosynthetic apparatus of *Arabidopsis thaliana* cultured *in vitro*," *Journal of Plant Growth Regulation*, vol. 31, pp. 90-101, 2012.
- [16] S. Adhikari, T. Bandyopadhyay, and P. Ghosh, "Assessment of genetic stability of *Cucumis sativus* L. regenerated from encapsulated shoot tips," *Scientia Horticulturae*, vol. 170, pp. 115-122, 2014.