

EFFECT OF KUDZU STARCH ON GROWTH, CHLOROPHYLL, LEAF MORPHOLOGY AND *IN VITRO* PROPAGATION OF CHRYSANTHEMUM

La Viet Hong^{1*}, Cao Phi Bang², Ong Xuan Phong¹, Ngo Thi Thuong¹,
 Nguyen Thi Le Thuy³, Duong Thi Thanh Thao⁴

¹Hanoi Pedagogical University 2, ²Hung Vuong University

³Vietnam Vocational College of Industry And Commerce, ⁴Hanoi Metropolitan University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 28/02/2022	In this study, the gelling ability for the tissue culture medium of Kudzu starch was investigated. The results showed that the post-autoclave pH of MS medium had no difference between Kudzu starch and agar (the control). The culture medium containing Kudzu starch positively impacted growth and physiological parameters but did not affect leaf morphology and total leaf area. Kudzu starch was added into the <i>in vitro</i> propagation medium of chrysanthemum gave positive results, was suitable for the regeneration and multiplication stage and <i>in vitro</i> rooting stage. <i>Chrysanthemum</i> plants derived from the medium using Kudzu starch expressed an equal survival rate to regenerated plants derived from media using agar. Kudzu starch has the potential to be used as a gelling agent for tissue culture.
Revised: 18/4/2022	
Published: 18/4/2022	
KEYWORDS	
Chrysanthemum	
Chlorophyll	
Morphology	
Growth	
Kudzu starch	
Propagation	

ẢNH HƯỞNG CỦA TINH BỘT Sắn DÂY ĐẾN SINH TRƯỞNG, DIỆP LỤC, HÌNH THÁI LÁ VÀ NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CỦA CÂY HOA CÚC

La Việt Hồng^{1*}, Cao Phi Bằng², Ong Xuân Phong¹, Ngô Thị Thương¹,
 Nguyễn Thị Lê Thùy³, Dương Thị Thanh Thảo⁴

¹Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2, ²Trường Đại học Hùng Vương

³Trường Cao đẳng Công thương Việt Nam, ⁴Trường Đại học Thủ đô Hà Nội

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 28/02/2022	Trong nghiên cứu này, khả năng gây đông môi trường nuôi cấy mô của tinh bột sắn dây đã được khảo sát. Kết quả cho thấy giá trị pH của môi trường MS sau khi khử trùng không có sự khác biệt giữa tinh bột sắn dây và agar (đối chứng). Môi trường nuôi cấy chứa tinh bột sắn dây có ảnh hưởng tích cực đến các chỉ tiêu sinh trưởng, sinh lý, nhưng không ảnh hưởng đến hình thái lá và diện tích lá tổng số. Tinh bột sắn dây được bổ sung vào môi trường nhân giống <i>in vitro</i> cây hoa cúc cho kết quả tích cực, thích hợp với giai đoạn tái sinh và nhân nhanh chồi <i>in vitro</i> và giai đoạn ra rễ <i>in vitro</i> . Cây cúc cấy mô có nguồn gốc từ môi trường sử dụng tinh bột sắn dây thể hiện tỷ lệ sống sót bằng với cây tái sinh có nguồn gốc từ môi trường sử dụng agar. Tinh bột sắn dây có tiềm năng ứng dụng như chất gây đông môi trường để nuôi cấy mô.
Ngày hoàn thiện: 18/4/2022	
Ngày đăng: 18/4/2022	
TỪ KHÓA	
Cây hoa cúc	
Diệp lục	
Hình thái	
Sinh trưởng	
Tinh bột sắn dây	
Nhân giống	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.5600>

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

1. Giới thiệu

Nhân giống *in vitro* là một phương pháp có nhiều ưu điểm như tạo ra cây giống sạch bệnh, không phụ thuộc vào mùa vụ, cây giống sản xuất ra đồng đều, số lượng lớn trên một không gian nhỏ. Tuy nhiên, giá thành của cây cấy mô luôn cao hơn so với giá thành của cây truyền thống [1]. Theo tính toán trên một đơn vị môi trường, chi phí cho chất gây đông (gelling agent) chiếm hơn 70% [2]. Agar, một heteropolysaccharide, là chất gây đông được sử dụng phổ biến trong môi trường nuôi cấy mô tế bào nhờ những ưu điểm như trong suốt, không độc và có khả năng chống lại quá trình chuyển hoá tiêu cực trong nuôi cấy mô [3].

Một số tinh bột thương mại từ sắn, lúa gạo, ngô và khoai tây cũng được nghiên cứu như chất gây đông môi trường nuôi cấy cây hoa mào gà (*Celosia sp.*), đã cho thấy tiềm năng của polysaccharide này [4]. Gần đây, nghiên cứu về chất gây đông môi trường nuôi cấy mô giảm giá thành sản xuất cây giống ở quy mô lớn đã được thực hiện trên một số đối tượng khác như ảnh hưởng của tinh bột cây cao lương và Isabgol (bắt nguồn từ hạt cây *Plantago ovata*) đến ba giống chuối thương mại [5], hoặc ảnh hưởng của tinh bột sắn đến vi nhân giống cây chuối [6].

Trên đối tượng cây hoa cúc cấy mô, chất gây đông môi trường gồm agar, bacto agar, tinh bột lúa mạch, tinh bột ngô, gum Gellan (Gelrite®), Phytigel, môi trường PDA (đường dextrose, nước chiết khoai tây, agar) và agar yến mạch đã được nghiên cứu trong vi nhân giống quang tự dưỡng cây này [7]. Tuy nhiên, đến nay vẫn chưa có nghiên cứu liên quan đến sử dụng tinh bột sắn dây làm chất gây đông môi trường cấy mô. Do vậy, mục đích của nghiên cứu này là đánh giá tiềm năng của tinh bột sắn dây như một chất gây đông trong môi trường nuôi cấy mô để góp phần làm giảm chi phí sản xuất cây giống hoa cúc bằng kỹ thuật này.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Vật liệu: giống cây hoa cúc đại đoá (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) cấy mô 30 ngày tuổi và tinh bột sắn dây do Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Khoa học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2 cung cấp.

- Môi trường nuôi cấy là MS cơ bản (Murashige và Skoog) (pH 5,8) [8], 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 hòa sinh trưởng 6-benzyl amino purin (BAP) và α -naphthalene acetic acid (NAA) (Dulcheffa, Hà Lan).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chuẩn bị môi trường và điều kiện nuôi cấy *in vitro*

Môi trường nuôi cấy được sử dụng cho tất cả các thí nghiệm là Murashige và Skoog (1962) [8] với 30 g/L⁻¹ sucrose (pH được điều chỉnh ở $5,7 \pm 0,1$ trước khi hấp tiệt trùng). Tinh bột sắn dây được sử dụng ở các hàm lượng khác nhau 50, 60, 70, 80 g.L⁻¹, đối chứng sử dụng agar 7 g.L⁻¹. Mỗi công thức thí nghiệm gồm 10 bình. Tất cả các bình của nghiệm thức được đặt trong phòng nuôi cấy với chu kỳ quang sáng/tối: 16h/8h (chiếu sáng dưới đèn huỳnh quang, cường độ ánh sáng 3000-4000 lux), nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.2.2. Xác định sự thay đổi pH môi trường nuôi cấy trước và sau khử trùng

Sau khi hấp tiệt trùng, 10 ml mỗi môi trường được đưa vào các ống nghiệm 22 x 150 mm và để đông đặc. Môi trường được nghiền đồng nhất với 10 ml nước cất 2 lần. Giá trị pH được đo bằng máy đo Sension+ PH1 Portable pH/ORP Meter (Hach, Hoa Kỳ).

2.2.3. Ảnh hưởng của tinh bột sắn dây đến sinh trưởng, hàm lượng diệp lục và hình thái lá

Các chồi cúc *in vitro* 30 ngày tuổi được cắt thành đoạn dài 2 cm và được sử dụng làm mẫu cấy trên tất cả các nghiệm thức. Sau 8 tuần nuôi cấy, chiều dài chồi (cm), số lá trên chồi, số rễ trên chồi,

chiều dài rễ, khối lượng tươi, khối lượng khô của toàn bộ chồi cúc *in vitro* được ghi nhận. Hàm lượng diệp lục cũng được xác định bằng phương pháp quang phổ sau khi được chiết bằng dung dịch acetone 80%. Các lá 8 tuần tuổi từ tất cả các nghiệm thức đã được quan sát và chụp ảnh, diện tích lá được tính toán bằng phần mềm ImageJ (ver 1.8.0).

2.2.4. Ảnh hưởng của tinh bột sắn dây đến quá trình vi nhân giống cây hoa cúc

Tái sinh và nhân nhanh chồi *in vitro*:

Thí nghiệm được thực hiện theo mô tả của Ssamula và Mukasa (2016) [6] với một số thay đổi nhỏ: đoạn thân cúc *in vitro* 30 ngày tuổi có chiều dài 2 cm được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 30 g.L⁻¹ sucrose và 6-benzyl adenine (BAP) 0,50 mg.L⁻¹. Chất gây đông môi trường là agar 50, 60, 70 và 80 (g) tinh bột sắn dây bổ sung. Đối chứng (ĐC) là môi trường chứa các thành phần tương tự ngoại trừ tinh bột sắn dây được thay bằng agar với hàm lượng 7 g.L⁻¹. Sau khi nuôi cấy bốn tuần, xác định các chỉ tiêu số chồi tái sinh trên mỗi mẫu cấy, chiều dài của chồi (cm), số lá trên chồi.

Ra rễ tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh và huấn luyện cây thích nghi với điều kiện tự nhiên:

Thí nghiệm được thực hiện theo mô tả của Ssamula và Mukasa (2016) [6] với một số thay đổi nhỏ: chồi cúc *in vitro* 14 ngày tuổi có chiều dài 3 cm được nuôi cấy trên môi trường tương tự như tái sinh và nhân nhanh nhưng thay BAP bằng NAA 0,25 mg.L⁻¹. Sau khi nuôi cấy hai tuần, xác định các chỉ tiêu: tỷ lệ ra rễ (%), số lượng rễ trên chồi, chiều dài của rễ (cm).

Cây *in vitro* hoàn chỉnh từ các công thức thí nghiệm được dùng để huấn luyện trên giá thể cát sạch, theo dõi tỷ lệ sống sót sau 7 ngày.

2.2.5. Phân tích thống kê

Tất cả các thí nghiệm được thiết kế kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với ba lần lặp lại. Ảnh hưởng của chất thực nghiệm được phân tích bằng phương sai một nhân tố ANOVA trong Excel [9]. Sự khác biệt của các giá trị trung bình đã được kiểm tra với sự khác biệt ít nhất có ý nghĩa (LSD) ở mức 0,05. Kết quả thí nghiệm được thể hiện trong tất cả các bảng dưới dạng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (SD). Dữ liệu dạng % được chuyển đổi bằng hàm arcsin(x)^{1/2} trước khi xử lý thống kê.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Sự thay đổi pH môi trường nuôi cấy trước và sau khử trùng

Giá trị pH của môi trường MS phụ thuộc vào việc bổ sung chất gây đông trước hoặc sau điều chỉnh pH về mức 5,7 $\pm$ 0,1 [10]. Trong nghiên cứu này, pH của môi trường được điều chỉnh sau khi cho tinh bột sắn dây vào. Kết quả cho thấy pH của môi trường sau khử trùng có chất gây đông khác nhau (agar và BSD) không thể hiện sự khác biệt và đều có xu hướng giảm so với pH của môi trường trước đó (Bảng 1).

Bảng 1. Sự thay đổi pH của môi trường MS cấy mô sử dụng tinh bột sắn dây làm chất gây đông

Yếu tố gây đông	Công thức	pH môi trường		Δ pH
		Trước khử trùng	Sau khử trùng	
Tinh bột sắn dây	ĐC		5,38 $\pm$ 0,02 ^a	0,32 ↓
	50		5,21 $\pm$ 0,01 ^a	0,49 ↓
	60	5,7 $\pm$ 0,1	5,22 $\pm$ 0,02 ^a	0,48 ↓
	70		5,15 $\pm$ 0,13 ^a	0,55 ↓
	80		5,09 $\pm$ 0,01 ^a	0,61 ↓

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

Quá trình khử trùng môi trường nuôi cấy mô có thể sẽ phân huỷ thành phần bên trong như thành phần không bền nhiệt hoặc làm xảy ra các phản ứng giữa các thành phần của môi trường, tạo ra chất độc đối với cây [11]. Do đó, cần tiếp tục đánh giá khả năng sinh trưởng của thực vật trên môi trường này.

3.2. Ảnh hưởng của tinh bột sắn dây đến sinh trưởng của chồi cúc in vitro

Trong nghiên cứu này, chồi cúc được nuôi cấy vào môi trường MS sử dụng tinh bột sắn dây làm chất gây đông. Kết quả được thể hiện ở Bảng 2 và Hình 1.

Bảng 2. Kết quả sinh trưởng của chồi cúc in vitro (sau 8 tuần nuôi cấy)

Công thức	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Chiều dài rễ (cm)	Số rễ/chồi	Khối lượng tươi (g/cây)	Khối lượng khô (g/cây)
Agar	5,33±0,25 ^b	12,33±0,58 ^b	11,00±4,36 ^b	11,33±1,15 ^{ab}	1,08±0,39 ^b	0,059±0,018 ^b
50	7,07±0,47 ^a	13,67±0,58 ^a	15,77±1,32 ^{ab}	12,00±1,00 ^a	1,71±0,26 ^a	0,100±0,014 ^a
60	4,80±0,40 ^{bc}	12,33±0,58 ^b	17,67±3,06 ^{ab}	10,00±1,73 ^{bc}	1,34±0,43 ^{ab}	0,086±0,029 ^{ab}
70	4,07±0,35 ^c	11,00±1,00 ^c	19,60±2,51 ^a	8,00±0,00 ^d	1,32±0,18 ^{ab}	0,090±0,013 ^{ab}
80	4,10±0,46 ^c	10,67±0,58 ^c	15,33±5,86 ^{ab}	9,00±0,00 ^{cd}	1,29±0,24 ^{ab}	0,090±0,017 ^{ab}

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 tinh bột sắn dây đến sinh trưởng của cây hoa cúc trong nuôi cấy mô
(a) môi trường sử dụng agar 7,0 g.L⁻¹; (b, c, d, e) môi trường sử dụng tinh bột sắn dây làm chất gây đông môi trường tương ứng 50, 60, 70 và 80 (g.L⁻¹). Thanh bar: 1 cm

Phân tích cho thấy, chồi cúc được nuôi cấy trên môi trường bổ sung tinh bột sắn dây có sự thay đổi rất rõ rệt về sự sinh trưởng. Hầu hết chỉ tiêu nghiên cứu gồm chiều cao chồi, số lá/chồi và số rễ/chồi, khối lượng tươi và khối lượng khô thể hiện sự khác biệt rõ rệt giữa các công thức thí nghiệm so với ĐC. Tuy nhiên, phụ thuộc vào hàm lượng BSD được đưa vào, các chỉ tiêu này tốt nhất ở CT 50 nhưng khi tăng hàm lượng BSD (ở 60, 70, 80) thì các chỉ tiêu này chỉ tương đương ĐC (sử dụng agar 7,0 g.L⁻¹). Các chỉ tiêu này ở công thức 50 lần lượt là 7,07 (cm); 13,67 (lá/chồi); 12,00 (rễ/chồi); 1,71 (g/cây tươi) và 0,100 (g/cây khô). Riêng chỉ tiêu chiều dài rễ không thể hiện sự khác biệt giữa ĐC và các công thức có bổ sung BSD. Kết quả này khá thú vị vì trước đây, bằng phương pháp vi nhân giống quang tự dưỡng cây cúc cho rằng chỉ những chất gây đông là agar/dẫn xuất của agar hoặc gellan gum (một sản phẩm thương mại) là thích hợp nhất cho sinh trưởng của chồi, trong khi những chất gây đông khác như bacto agar, tinh bột lúa mì, tinh bột ngô hay môi trường hỗn hợp PDA (nước chiết khoai tây, dextrose, agar) không phù hợp [7]. Nguyên nhân có thể do tinh bột sắn dây có chứa khoảng 20,8 - 21% amylose, 20,5% amylopectin

cao [12], các thành phần này đóng vai trò như nguồn carbon, có thể đã ảnh hưởng tích cực đến quá trình sinh trưởng của cây cúc *in vitro*.

3.3. Ảnh hưởng của tinh bột sắn dây đến sắc tố quang hợp

Quá trình quang hợp đóng vai trò rất quan trọng, tạo ra nguồn năng lượng cung cấp cho cây trồng [13]. Diệp lục a, b là sắc tố quang hợp chính của quá trình này, tỷ lệ giữa diệp lục a/b phụ thuộc vào điều kiện nuôi trồng. Trong nghiên cứu này, hàm lượng diệp lục a, b và tổng số được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Hàm lượng diệp lục trong lá của cây hoa cúc cấy mô (sau 8 tuần nuôi cấy)

Công thức	Diệp lục a (mg/g)	Diệp lục b (mg/g)	Diệp lục a+b (mg/g)
Agar	0,284±0,0030 ^e	0,459±0,0043 ^c	0,743±0,0074 ^e
50	0,636±0,0003 ^a	0,496±0,0001 ^b	1,132±0,0002 ^b
60	0,626±0,0012 ^b	0,652±0,0005 ^a	1,277±0,0007 ^a
70	0,586±0,0023 ^d	0,403±0,0005 ^d	0,989±0,0018 ^c
80	0,599±0,0001 ^c	0,271±0,0002 ^e	0,870±0,0003 ^d

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

Kết quả thí nghiệm cho thấy các công thức thí nghiệm (bổ sung BSD), hàm lượng diệp lục đều cao hơn ĐC nhưng không giống nhau ở các hàm lượng BSD được sử dụng. Cụ thể, hàm lượng diệp lục a cao nhất ở công thức bổ sung 50 g.L⁻¹ (đạt 0,636 mg/g), trong khi đó hàm lượng diệp lục b và diệp lục tổng số cao nhất ở công thức bổ sung 60 và 70 g.L⁻¹, lần lượt là 0,652 (mg/g) và 1,277 (mg/g).

3.4. Ảnh hưởng của tinh bột sắn dây đến diện tích lá, hình thái lá

Lá là cơ quan rất quan trọng đối với quang hợp của thực vật. Trong nghiên cứu này, diện tích lá tổng số và hình thái lá được nghiên cứu. Kết quả thể hiện ở Bảng 4 và Hình 2.

Bảng 4. Diện tích lá tổng số của cây hoa cúc dưới ảnh hưởng của chất gây đông (sau 8 tuần nuôi cấy)

Công thức	ĐC	BSD 50	BSD 60	BSD 70	BSD 80
Diện tích lá tổng số (cm ²)	1,71±0,62 ^a	1,30±0,74 ^{ab}	1,30±0,66 ^{ab}	1,20±0,72 ^{ab}	0,97±0,66 ^b

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



Hình 2. Hình ảnh hình thái lá của cây hoa cúc cấy mô

(a): Hình thái lá cây nuôi cấy trên môi trường sử dụng agar 7,0 g.L⁻¹; (b, c, d, e) là hình thái tương ứng ở môi trường sử dụng tinh bột sắn dây làm chất gây đông môi trường tương ứng 50, 60, 70 và 80 (g.L⁻¹)

Kết quả cho thấy không có sự khác biệt rõ rệt về diện tích lá tổng số giữa cây được nuôi cấy trong môi trường sử dụng agar so với môi trường sử dụng tinh bột sắn dây để gây đông, trừ công thức BSD 80 khi nồng độ tinh bột sắn dây cao. Về mặt hình thái cho thấy hình dạng lá, hình dạng khí khổng trên bề mặt lá điển hình, đặc trưng, không thể hiện sự khác biệt giữa các công thức thí nghiệm và ĐC. Như vậy, tinh bột sắn dây rất có tiềm năng thúc đẩy sinh trưởng của cây hoa cúc trong điều kiện cấy mô.

3.5. Nhân giống *in vitro* cây hoa cúc sử dụng tinh bột sắn dây làm chất gây đông môi trường cấy mô

Tái sinh và nhân nhanh chồi:

Chất gây đông là một trong những yêu cầu cơ bản nhất để nuôi cấy mô thành công, nó ảnh hưởng rất rõ rệt đến khả năng tái sinh chồi bất định [14]. Trong nghiên cứu này, sự tái sinh và nhân nhanh của chồi cây cúc trên môi trường sử dụng tinh bột sắn dây đã được thực hiện, kết quả thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả tái sinh và nhân nhanh chồi cúc sử dụng tinh bột sắn dây làm chất gây đông môi trường (sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi
ĐC	5,25±0,96 ^a	1,57±0,15 ^b	9,33±0,58 ^b
BSD 50	5,50±1,29 ^a	2,83±0,40 ^a	11,33±0,58 ^a
BSD 60	5,25±1,26 ^a	1,47±0,15 ^b	7,33±0,58 ^c
BSD 70	5,75±0,96 ^a	0,97±0,12 ^c	6,67±0,58 ^{cd}
BSD 80	5,50±1,29 ^a	1,07±0,06 ^c	6,00±0,00 ^d

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

Phân tích cho thấy việc bổ sung tinh bột sắn dây ảnh hưởng đến quá trình tái sinh và nhân nhanh chồi cúc *in vitro*. Tuy nhiên, sự ảnh hưởng tùy thuộc vào mỗi chỉ tiêu. Cụ thể việc bổ sung BSD không cho thấy sự khác biệt về số chồi/mẫu nhưng gây ra sự khác nhau rõ rệt về chiều cao chồi và số lá/chồi. Trong đó, BSD 50 là phù hợp nhất so với các công thức nghiên cứu còn lại, thể hiện ở chiều cao chồi đạt 2,83 (cm), số lá/chồi đạt 11,33 (lá/chồi), các công thức còn lại có bổ sung BSD chỉ tương đương hoặc thấp hơn so với ĐC.

Ra rễ tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh và huấn luyện cây thích nghi với điều kiện tự nhiên:

Sự ra rễ ở chồi cúc *in vitro* thường rất dễ dàng trong môi trường MS chứa agar ngay cả khi không có mặt chất điều hòa sinh trưởng. Ảnh hưởng của tinh bột sắn dây đối với quá trình này được thể hiện ở Bảng 6 và Hình 3.

Bảng 6. Kết quả ra rễ tạo cây cúc cấy mô hoàn chỉnh sử dụng tinh bột sắn dây (sau 2 tuần nuôi cấy)

Công thức	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)
ĐC	100	13,00±1,00 ^a	1,37±0,06 ^b
BSD 5	100	9,33±0,58 ^b	1,83±0,15 ^a
BSD 6	100	8,67±0,58 ^b	1,73±0,12 ^a
BSD 7	100	7,33±0,58 ^c	1,37±0,15 ^b
BSD 8	100	6,33±0,58 ^c	1,23±0,06 ^b

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 tinh bột sắn dây đến ra rễ tạo cây cấy mô hoàn chỉnh

(a) môi trường sử dụng agar 7,0g.L⁻¹; (b, c, d, e) môi trường sử dụng tinh bột sắn dây làm chất gây đông môi trường tương ứng 50, 60, 70 và 80 (g.L⁻¹). Thanh bar: 1 cm

Kết quả cho thấy, tỷ lệ ra rễ của chồi cúc *in vitro* không bị ảnh hưởng bởi chất gây đông (agar hay tinh bột sắn dây), tỷ lệ ra rễ đều đạt 100%. Tuy nhiên, chất gây đông lại ảnh hưởng rõ rệt đến số rễ/chồi và chiều dài rễ. Cụ thể, số rễ/chồi là cao nhất ở ĐC (sử dụng agar) (13,00 rễ/chồi), nhưng chiều dài rễ lại cao nhất ở BSD 50 và BSD 60, tương ứng 1,83 và 1,73 (cm).

Bảng 7. Tỷ lệ sống sót của cây cúc *in vitro* trong quá trình huấn luyện thích nghi (sau 7 ngày thí nghiệm)

Công thức	ĐC	BSD 50	BSD 60	BSD 70	BSD 80
Tỷ lệ sống sót (%)	92,33±2,52 ^a	90,67±2,08 ^{ab}	90,33±1,53 ^{ab}	90,33±2,08 ^{ab}	88,33±1,53 ^b

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

Ở các công thức nghiên cứu, rễ cây cúc được hình thành ở các CT BSD có lớp môi trường bao xung quanh nhiều hơn so với ĐC (Hình 3). Tỷ lệ sống không thể hiện sự khác biệt rõ rệt giữa ĐC và BSD, ngoại trừ BSD 80, tỷ lệ sống sót thấp chỉ đạt 88,33%; trong khi đó, các CT còn lại đều dao động trên 90% (Bảng 7). Kết quả này cho thấy, BSD nồng độ 50-70 mg.L⁻¹ không ảnh hưởng tiêu cực đến quá trình huấn luyện, điều này cũng phù hợp với nghiên cứu trước đây của McClelland và cộng sự (1990) khi chỉ ra rằng có ít nhất 50% rễ cây *in vitro* trong quá trình huấn luyện hoặc bị chết nhanh chóng hoặc không tạo ra bất kỳ ảnh hưởng phát triển nào [15].

4. Kết luận

BSD (50, 60, 70 và 80 g.L⁻¹) được sử dụng như chất gây đông tiềm năng dùng trong nhân giống *in vitro* cây hoa cúc. Giá trị pH của môi trường MS sử dụng tinh bột sắn dây sau khi khử trùng tương đương với giá trị pH của môi trường sử dụng agar 7,0 g.L⁻¹. Đối với quá trình sinh trưởng của cây cúc cấy mô, sử dụng tinh bột sắn dây cho chỉ tiêu sinh trưởng, sinh lý và đặc điểm hình thái lá tốt hơn hoặc tương đương so với ĐC. Ở các giai đoạn tái sinh và nhân nhanh, giai đoạn ra rễ tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh, BSD được sử dụng như chất gây đông thay thế agar. Tỷ lệ sống sót của cây cấy mô không bị ảnh hưởng bởi BSD như chất gây đông môi trường nuôi cấy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] S. Purohit, J. Teixeira da Silva, and N. Habibi, "Current approaches for cheaper and better micropropagation technologies," *International Journal of Plant Developmental Biology*, vol. 5, pp. 1-36, 2011.
- [2] S. Prakash, M. I. Hoque, and T. Brinks, *Culture media and containers*, International Atomic Energy Agency (IAEA) 1011-428992-0-115903-X, 2004.
- [3] J. McLachlan, "Macroalgae (seaweeds): Industrial resources and their utilization," *Plant and Soil*, vol. 89, pp. 137-157, 1985.
- [4] N. Daud, R. Taha, N. Noor, and H. Alimon, "Potential of alternative gelling agents in media for the *in vitro* micro-propagation of *Celosia* sp," *International Journal of Botany*, vol. 7, pp. 183-188, 2011.
- [5] M. S. Saraswathi, S. Uma, G. Kannan, M. Selvasumathi, M. M. Mustaffa, and S. Backiyarani, "Cost-effective tissue culture media for large-scale propagation of three commercial banana (*Musa* spp.) varieties," *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, vol. 91, pp. 23-29, 2016.
- [6] A. Ssamula and S. B. Mukasa, "Use of cassava starch as gelling agent during *in vitro* micropropagation of banana," *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, vol. 3, pp. 575-581, 2015.
- [7] J. Teixeira da Silva, "Novel factors affecting shoot culture of *chrysanthemum* (*Dendranthema* × *Grandiflora*)," *Botanica Lithuanica*, vol. 20, no. 1, pp. 27-40, 2014.
- [8] 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.
- [9] V. M. Nguyen, V. H. La, and X. P. Ong, *Methods in plant physiology*. Hanoi: Hanoi National University Publishing House, 2013.
- [10] H. R. Owen, D. Wengerd, and A. R. Miller, "Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method," *Plant Cell Rep*, vol. 10, pp. 583-586, 1991.

-
- [11] N. Schenk, K. C. Hsiao, and C. H. Bornman, "Avoidance of precipitation and carbohydrate breakdown in autoclaved plant tissue culture media," *Plant Cell Rep*, vol. 10, pp. 115-119, 1991.
- [12] A. Suzuki, S. Hizukuri, and Y. Takeda, "Physicochemical studies of kuzu starch," *Cereal Chemistry*, vol. 58, pp. 286-290, 1981.
- [13] N. R. Baker, "Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*," *Annu Rev Plant Biol*, vol. 59, pp. 89-113, 2008.
- [14] P. Modi, A. Sinha, and S. L. Kothari, "Reduction of hyperhydricity in micropropagated French Marigold (*Tagetes patula* L.) plants by modified medium parameters," *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, vol. 3, no. 1, pp. 40-45, 2009.
- [15] M. T. McClelland, M. A. L. Smith, and Z. B. Carothers, "The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 23, pp. 115-123, 1990.