

# ẢNH HƯỞNG CỦA THAN HOẠT TÍNH VÀ NUÔI CẤY THOÁNG KHÍ LÊN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA CÂY HOA ĐỒNG TIỀN (*GERBERA JAMESONII*) *IN VITRO* VÀ *EX VITRO*

Nguyễn Thị Kim Yến, Nguyễn Phúc Huy, Hoàng Văn Cương, Nguyễn Thị Nhật  
Linh, Nguyễn Bá Nam, Vũ Quốc Luận, Dương Tấn Nhựt\*

Viện Sinh học Tây Nguyên, Viện HLKHCNVN, 116 Xô Viết Nghệ Tĩnh, Đà Lạt, Lâm Đồng

\*Email: duongtannhut@gmail.com

Đến Toà soạn: 28/6/2012; Chấp nhận đăng: 17/8/2013

## TÓM TẮT

Cây hoa Đồng tiền (*Gerbera jamesonii*) là một trong những loài hoa có giá trị kinh tế cao được trồng phổ biến ở nhiều quốc gia trên thế giới. Hoa đồng tiền được sử dụng làm hoa chậu, hoa cắt cành hay hoa trồng cảnh. Nhu cầu đặt ra cho vi nhân giống cây hoa Đồng tiền hiện nay là cải thiện hệ thống và môi trường nuôi cấy nhằm nâng cao chất lượng cây hoa Đồng tiền *in vitro* và đáp ứng nhu cầu cung cấp cây giống ở quy mô lớn. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát ảnh hưởng của than hoạt tính và nuôi cấy thoáng khí lên khả năng sinh trưởng và phát triển của cây hoa Đồng tiền *in vitro* và *ex vitro*. Kết quả cho thấy môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucrose, 9 g/l agar và 1 g/l than hoạt tính ở điều kiện nuôi cấy thoáng khí là môi trường thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển cây hoa Đồng tiền. Vị trí của than hoạt tính trong môi trường nuôi cấy ít ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của cây hoa Đồng tiền *in vitro*. Cây hoa Đồng tiền nuôi cấy thoáng khí trên môi trường MS có bổ sung 1 g/l than hoạt tính khi chuyển ra điều kiện *ex vitro* có tỉ lệ sống sót rất cao (95 %).

**Từ khóa:** cây hoa Đồng tiền (*Gerbera jamesonii*), *ex vitro*, *in vitro*, nuôi cấy thoáng khí, than hoạt tính.

## 1. MỞ ĐẦU

Hoa Đồng tiền (*Gerbera jamesonii*) là một loài hoa có giá trị kinh tế cao, đa dạng về màu sắc, hình dáng thanh mảnh nên chúng được trồng phổ biến ở nhiều quốc gia và được xếp vào nhóm mười loài hoa được tiêu thụ mạnh nhất trên thế giới. Cây hoa Đồng tiền thường được nhân giống bằng cách gieo hạt hoặc tách cây con. Tuy nhiên, hai phương pháp nhân giống này thường cho chất lượng cây con kém, không đồng nhất về mặt di truyền và không đáp ứng được nhu cầu cung cấp cây giống trên quy mô lớn. Để giải quyết vấn đề này người ta đã sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mô để nhân giống cây hoa Đồng tiền. Bên cạnh đó, cây hoa Đồng tiền nuôi cấy mô thường có tỉ lệ sống sót thấp khi chuyển ra vườn ươm. Việc cải tiến và tối ưu hóa hệ thống nuôi cấy vẫn luôn là một trong những mục tiêu chính của vi nhân giống thương mại cây hoa Đồng tiền. Các cây con tạo ra cần có khả năng quang hợp tốt và thích nghi với các điều kiện *ex vitro* [1]. Do vậy, nhu cầu đặt ra cho vi nhân giống cây hoa Đồng tiền hiện nay là cần cải thiện hệ thống và

môi trường nuôi cấy nhằm nâng cao chất lượng cây hoa Đồng tiền *in vitro* để đáp ứng nhu cầu cây giống ở quy mô lớn.

Than hoạt tính (Activated charcoal - AC) là dạng vô định hình của carbon, có khả năng hấp thụ khí, hơi nước và chất lỏng dạng keo. Việc bổ sung AC vào môi trường nuôi cấy có thể thúc đẩy hay ức chế sự tăng trưởng của thực vật *in vitro*; các tác động của AC bao gồm: tạo điều kiện tối trong môi trường nuôi cấy, hấp thụ các chất ức chế trong môi trường nuôi cấy, hấp thụ các chất điều hòa sinh trưởng thực vật và các hợp chất hữu cơ khác đồng thời phóng thích các cơ chất có lợi cho sự sinh trưởng của thực vật nuôi cấy *in vitro* [2]. Bổ sung AC vào môi trường nuôi cấy có thể ảnh hưởng đến sự ra rễ, kéo dài chồi và phát sinh phôi [3]. Dumas và Montuuis (1995) đã nhận thấy rằng trong suốt quá trình ra rễ *in vitro* của chồi *Pinus pinaster* thì việc bổ sung AC vào môi trường ra rễ không những cải thiện tỉ lệ ra rễ [4], số lượng và chiều dài rễ mà còn thúc đẩy khả năng ra rễ bất định. AC có thể hấp thụ ethylene được phóng thích từ môi trường [5] và có thể làm giảm đáng kể hiện tượng thủy tinh thể ở chồi cây Hành (*Allium cepa* L.) [6].

Trong nuôi cấy *in vitro*, việc sử dụng bình nuôi cấy kín có tác dụng ngăn ngừa sự xâm nhiễm của các vi sinh vật và sự thoát hơi nước. Tuy nhiên, dạng bình nuôi cấy kín có độ ẩm trong bình tương đối cao làm cho cây bị thủy tinh thể, cây phát triển chậm, hình thái sinh lí dị thường dẫn đến tỉ lệ sống sót thấp khi đưa ra vườn ươm [7]. Cây con phát triển dưới điều kiện độ ẩm tương đối thấp sẽ tránh được hiện tượng thủy tinh thể [8] và việc sử dụng hệ thống nuôi cấy thoáng khí giúp cải thiện hiện tượng thủy tinh thể ở cây hoa Bibi (*Gypsophyla paniculata* L.) [9], cây hoa Cẩm chướng (*Dianthus caryophyllus* L.) [10], nâng cao sự sinh trưởng ở cây Dâu tây (*Fragaria × ananassa*) [11]. Sử dụng hệ thống nuôi cấy thoáng khí giúp tăng khả năng trao đổi khí trong bình với môi trường ngoài bình nhằm tăng hàm lượng CO<sub>2</sub>, giảm hàm lượng O<sub>2</sub> trong bình nuôi cấy từ đó tăng khả năng quang hợp của cây *in vitro* [12] và giảm nồng độ khí ethylene [13]. Điều này góp phần cải thiện tỉ lệ sống sót của cây mô khi đưa ra vườn ươm [14]. Chính vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục đích tìm ra nồng độ AC tối ưu cho quá trình ra rễ cây hoa Đồng tiền *in vitro*, cũng như hệ thống nuôi cấy thích hợp cho quá trình ra rễ cây hoa Đồng tiền *in vitro* và khảo sát tỉ lệ sống, sự sinh trưởng và phát triển của chúng khi đưa ra ngoài vườn ươm.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu

#### 2.1.1. Mẫu cấy

Nguồn mẫu sử dụng trong nghiên cứu này là các chồi cây hoa Đồng tiền *in vitro* có 3 lá, chiều cao khoảng 3 cm được thu nhận trên môi trường MS [16] có bổ sung 30 g/l đường sucrose, 9 g/l agar.

#### 2.1.2. Hệ thống nuôi cấy

Các chồi được nuôi cấy trong bình thủy tinh 250 ml với 40 ml môi trường, nắp đậy là film nylon. Đối với thí nghiệm về nuôi cấy thoáng khí, các cây được nuôi cấy trong các bình thủy tinh tương tự như trên với nắp đậy là film nylon được khoan một lỗ có đường kính 0,5 cm, dán kín lỗ đã khoan bằng màng Millipore (Millipore Ltd., Nhật Bản), kích thước lỗ của màng 0,5 μm, đường kính 1,8 cm.

### 2.1.3. Môi trường nuôi cấy

Môi trường được sử dụng trong thí nghiệm là môi trường MS có bổ sung 30 g/l đường sucrose và 9 g/l agar. pH môi trường được điều chỉnh 5,8 trước khi hấp khử trùng bằng autoclave ở 121 °C, 1 atm trong thời gian 40 phút.

## 2.2. Phương pháp

### 2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ AC lên khả năng sinh trưởng và phát triển của cây hoa Đồng tiền *in vitro*

#### Nồng độ AC trong môi trường nuôi cấy

Các chồi cây hoa Đồng tiền *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 30 g/l đường sucrose, 9 g/l agar và AC (Guangdong Guanghua Sci-Tech Co., Ltd., Trung Quốc) ở các nồng độ khác nhau (0; 0,5; 1,0 và 2,0 g/l), với mục đích tìm ra nồng độ AC tối ưu cho giai đoạn tạo rễ của cây hoa Đồng tiền *in vitro* [15].

#### Vị trí lớp AC trong môi trường nuôi cấy

Các chồi cây hoa Đồng tiền *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 30 g/l đường sucrose, 9 g/l agar và bố trí vị trí các lớp AC khác nhau.

- 1 lớp: môi trường không bổ sung AC hoặc bổ sung AC.
- 2 lớp: lớp trên là môi trường có bổ sung AC và lớp dưới là môi trường không bổ sung AC hoặc ngược lại (mỗi lớp 20 ml).

### 2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nuôi cấy thoáng khí lên khả năng sinh trưởng và phát triển của cây hoa Đồng tiền *in vitro* và *ex vitro*

#### Khả năng sinh trưởng và phát triển của cây hoa Đồng tiền *in vitro*

Các chồi cây hoa Đồng tiền *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 30 g/l đường sucrose, 9 g/l agar và AC ở nồng độ thích hợp (thu được ở thí nghiệm trên) và được nuôi cấy trong bình thủy tinh với nắp đậy có hoặc không có màng Millipore.

#### Khả năng sinh trưởng và phát triển của cây hoa Đồng tiền *ex vitro*

Các cây hoa Đồng tiền nuôi cấy *in vitro* được thu nhận từ hệ thống nuôi cấy thoáng khí và không thoáng khí (30 cây ở mỗi nghiệm thức) được rửa sạch agar, sau đó trồng vào chậu với giá thể là xơ dừa trộn với đất mùn theo tỉ lệ 1 : 1. Trong tuần đầu sau khi trồng, tưới phun sương 2 lần/ngày, sau đó tưới 1 lần/ngày vào sáng sớm và chiều mát. Phun thuốc phòng trừ nấm bệnh 1 - 2 lần/tuần. Bón phân NPK (16 : 16 : 8) (20 g/l) 1 lần/tuần.

### 2.2.3. Quan sát hình thái khí khổng

Các mẫu lá được lấy ở vị trí thứ năm hoặc thứ sáu từ dưới lên trong điều kiện nuôi cấy không thoáng khí và thoáng khí để quan sát số lượng khí khổng (được đo trên đơn vị diện tích là 900  $\mu\text{m}^2$ ) và độ mở khí khổng. Vỏ biểu bì được tách từ bề mặt dưới dọc theo trục của lá, sau đó

được quan sát và chụp ảnh bằng kính hiển vi quang học (Keynce Corporation, Japan) có thang đo ở vật kính  $\times 10$  và  $\times 100$ .

#### 2.2.4. Điều kiện thí nghiệm

Thí nghiệm *in vitro* được tiến hành ở điều kiện nhiệt độ  $25 \pm 2$  °C, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày với cường độ chiếu sáng  $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  và độ ẩm trung bình 75 – 80 %.

Thí nghiệm *ex vitro* được tiến hành ở điều kiện nhiệt độ 17 – 25 °C, độ ẩm trung bình 85 – 90 % và sử dụng ánh sáng tự nhiên có che sáng 40 %.

#### 2.2.5. Chỉ tiêu theo dõi và xử lý thống kê

Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm: khối lượng tươi (g), khối lượng khô (g), chiều cao cây (cm), số lượng lá, đường kính lá (cm), chiều dài lá (cm), số lượng rễ, chiều dài rễ (cm), số lượng khí khổng, độ mở khí khổng ( $\mu\text{m}$ ) và tỉ lệ sống sót ngoài vườn ươm (%).

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần thí nghiệm tiến hành trên 10 bình, mỗi bình cấy 3 mẫu. Các số liệu được thu nhận sau 4 tuần nuôi cấy. Số liệu được xử lý và phân tích bằng phần mềm SPSS 16.0 theo phép thử Duncan với  $\alpha = 0,05$  [16].

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Ảnh hưởng của AC lên khả năng sinh trưởng và phát triển của cây hoa Đồng tiền *in vitro*

Nồng độ AC trong môi trường nuôi cấy

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ AC lên khả năng sinh trưởng và phát triển của cây hoa Đồng tiền *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy.

Chỉ tiêu theo dõi	Nồng độ AC (g/l)			
	0	0,5	1,0	2,0
Khối lượng tươi (g)	1,59b*	1,71b	2,40a	1,96b
Khối lượng khô (g)	0,08b	0,09b	0,17a	0,09b
Chiều cao cây (cm)	6,05b	6,73b	6,33b	7,93a
Số lượng lá	9,67b	9,00b	13,33a	8,67b
Đường kính lá (cm)	1,52c	1,76b	2,00a	1,70bc
Chiều dài lá (cm)	1,52c	1,88b	2,10a	1,90b
Số lượng rễ	2,83b	1,67c	4,33a	1,67c
Chiều dài rễ (cm)	5,12a	3,99b	3,86b	4,09b

Ghi chú: \* Các chữ cái a, b,... trong cùng một dòng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với  $\alpha = 0,05$  trong phép thử Duncan.

Kết quả thu được cho thấy AC có tác động lên sự sinh trưởng và phát triển của cây hoa Đồng tiền *in vitro* (bảng 1, hình 1a). Sau 4 tuần nuôi cấy, ở nghiệm thức không bổ sung AC thì các cây hoa Đồng tiền sinh trưởng và phát triển kém hơn so với các môi trường có bổ sung AC, với các chỉ tiêu thu được đều thấp hơn [khối lượng tươi 1,59 g, khối lượng khô 0,08 g, chiều cao cây 6,05 cm, số lượng lá (9,67 lá), đường kính lá 1,52 cm, chiều dài lá 1,52 cm, số lượng rễ (2,83 rễ)] (bảng 1). Ở nghiệm thức bổ sung 1,0 g/l AC, sự sinh trưởng của cây là tối ưu nhất với các chỉ tiêu về sinh trưởng của cây đạt cao nhất (bảng 1). Kết quả cũng cho thấy AC có tác động ức chế sự kéo dài rễ. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả của Szule và Rogozinska (1994), cho rằng chiều dài rễ của hai giống Đồng tiền ‘Monoco’ và ‘King’ bị ức chế khi nuôi cấy trên môi trường bổ sung AC [17]. Tuy nhiên, khi bổ sung AC ở nồng độ 0,5 hoặc 2,0 g/l thì khối lượng tươi, khối lượng khô, số lượng lá, đường kính lá, chiều dài lá và số lượng rễ của cây đều giảm so với khi bổ sung 1,0 g/l AC (bảng 1).

Vai trò của AC cũng đã được nghiên cứu trên nhiều đối tượng cây khác nhau. Trong nghiên cứu này, AC đã có tác động tích cực đến sự sinh trưởng của cây hoa Đồng tiền nuôi cấy *in vitro* (Bảng 1). Điều này có thể được giải thích là do AC đã tạo điều kiện tối cho môi trường nuôi cấy, hấp phụ các chất độc như các phenolic hay dịch rỉ nâu tiết ra từ mẫu hay môi trường nuôi cấy [2]. Ngoài ra, AC cũng có thể hấp phụ các vitamin, cytokinin và auxin [2], làm thay đổi tỉ lệ thành phần các chất có trong môi trường nuôi cấy cũng như pH môi trường [18]. Tuy nhiên, tác động của AC lên sự sinh trưởng của các cây khác nhau cũng khác nhau. Khi bổ sung AC ở các nồng độ khác nhau thì cũng tác động khác nhau đến sự sinh trưởng và phát triển của cây hoa Đồng tiền *in vitro* (Bảng 1). Bổ sung AC ở nồng độ 1,0 mg/l là thích hợp nhất cho giai đoạn tạo rễ cây hoa Đồng tiền *in vitro*. Tuy nhiên, khi sử dụng AC ở nồng độ thấp hoặc cao hơn lại không tác động đáng kể đến sự gia tăng sinh trưởng, có lẽ ở nồng độ AC thấp, chưa tạo được môi trường đủ tối cũng như hấp thụ các chất độc trong môi trường. Mặt khác, có lẽ do nồng độ 2,0 g/l AC quá cao, đã làm thay đổi các thành phần của môi trường nuôi cấy cũng như hấp thụ các hợp chất và chất điều hòa tăng trưởng cần thiết cho sự sinh trưởng của cây và trở nên không hiệu quả trong việc kích thích sự sinh trưởng của cây. Như vậy, môi trường MS có bổ sung 30 g/l đường sucrose, 9 g/l agar và 1,0 g/l AC là môi trường phù hợp nhất cho sự sinh trưởng và phát triển của cây hoa Đồng tiền *in vitro*.

#### *Vị trí lớp AC trong môi trường nuôi cấy*

Từ khi biết được ứng dụng của AC trong nuôi cấy *in vitro*, các nhà khoa học chủ yếu nghiên cứu ảnh hưởng của AC trong việc cải tiến môi trường nuôi cấy [18]. Trong khi đó, các nghiên cứu về ảnh hưởng của vị trí AC trong bình môi trường lên sự sinh trưởng của các cây *in vitro* hầu như chưa có công bố nào về vấn đề này. Trong thí nghiệm này, chồi cây hoa Đồng tiền *in vitro* được cấy trên môi trường với các lớp môi trường khác nhau, một hoặc hai lớp môi trường. Kết quả về sự sinh trưởng của cây hoa Đồng tiền *in vitro* được thu nhận sau 4 tuần nuôi cấy (bảng 2, hình 1a).

Kết quả thu được sau 4 tuần cho thấy, vị trí của lớp AC không ảnh hưởng nhiều lên sự sinh trưởng và phát triển của cây hoa Đồng tiền ở giai đoạn ra rễ *in vitro* (Bảng 2, Hình 1a). Khối lượng tươi, khối lượng khô, số lượng lá đạt cao nhất ở nghiệm thức có bổ sung 1 g/l AC với 1 lớp môi trường và có sự khác biệt đáng kể so với nghiệm thức đối chứng. Chiều cao cây giữa các nghiệm thức không có sự khác biệt đáng kể. Đường kính lá, chiều dài lá, số lượng rễ thu được là thấp nhất khi các cây được nuôi cấy trên môi trường không bổ sung AC và ở các nghiệm thức có bổ sung AC 1 lớp hoặc 2 lớp thì không có sự khác biệt đáng kể. AC đã làm tăng số lượng rễ; tuy nhiên, nó lại có tác động ức chế sự kéo dài rễ, chiều dài rễ đạt thấp nhất ở nghiệm

thức 1 mg/l AC, ở các nghiệm thức còn lại thì sự khác biệt về chiều dài rễ là không đáng kể (bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của vị trí lớp AC trong môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng và phát triển của cây hoa Đồng tiền *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy.

Chỉ tiêu theo dõi	AC (g/l)			
	0	1	0/1	1/0
Khối lượng tươi (g)	1,59c*	2,40a	2,20ab	1,87bc
Khối lượng khô (g)	0,08c	0,17a	0,12b	0,10bc
Chiều cao cây (cm)	6,05ab	6,33ab	6,45a	5,77b
Số lượng lá	9,67c	13,33a	11,50b	9,33c
Đường kính lá (cm)	1,52b	2,00a	1,88a	1,85a
Chiều dài lá (cm)	1,52b	2,10a	1,98a	1,95a
Số lượng rễ	2,83c	4,33a	4,00ab	3,17ab
Chiều dài rễ (cm)	5,12a	3,99b	4,84a	5,04a

Ghi chú: \* Các chữ cái a, b,... trong cùng một dòng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với  $\alpha = 0,05$  trong phép thử Duncan.

0/1: lớp trên không bổ sung AC và lớp dưới bổ sung 1 (g/l) AC; 1/0: lớp trên bổ sung 1 g/l AC và lớp dưới không bổ sung AC.

Từ kết quả thu nhận được cho thấy việc bổ sung AC vào môi trường nuôi cấy đã làm gia tăng sự sinh trưởng của cây trong giai đoạn ra rễ cây hoa Đồng tiền *in vitro*. Tuy nhiên, vị trí của AC trong môi trường lại không ảnh hưởng nhiều đến sự sinh trưởng của cây hoa Đồng tiền nuôi cấy *in vitro*. Như vậy, môi trường MS 1 lớp có bổ sung 1 g/l AC là môi trường thích hợp nhất cho sự sinh trưởng của cây hoa Đồng tiền *in vitro*.

### 3.2. Ảnh hưởng của nuôi cấy thoáng khí lên khả năng sinh trưởng và phát triển của cây hoa Đồng tiền *in vitro* và *ex vitro*

#### Khả năng sinh trưởng và phát triển của cây hoa Đồng tiền *in vitro*

Kết quả thu được cho thấy sự sinh trưởng của cây hoa Đồng tiền ở hai hệ thống nuôi cấy là khác nhau (bảng 3, hình 1b). Khối lượng tươi thu được là cao hơn ở cây hoa Đồng tiền nuôi cấy trong các bình không thoáng khí (2,4 g). Tuy nhiên, khối lượng khô của các cây nuôi cấy trong bình không thoáng khí (0,1 g) lại đạt thấp hơn các cây nuôi cấy trong bình thoáng khí (0,17 g) (bảng 3). Kết quả cũng cho thấy rằng số lượng lá, chiều cao cây và số lượng rễ đạt cao hơn khi các cây được nuôi cấy trong hệ thống không thoáng khí (bảng 3). Nuôi cấy thoáng khí đã có vai trò quan trọng trong sự mở rộng của lá. Đường kính và chiều dài lá thu được là cao hơn khi các cây được nuôi cấy trong các bình thoáng khí. Bên cạnh đó, nuôi cấy thoáng khí cho số lượng rễ ít hơn nhưng lại kích thích sự kéo dài rễ với chiều dài rễ thu được đạt cao hơn ở các cây nuôi cấy thoáng khí (bảng 3).

Nuôi cấy thoáng khí tác động đến sự trao đổi khí, hoạt động của nước, vi môi trường và sự cân bằng hormone trong các bình nuôi cấy [19]. Trong nghiên cứu này, khối lượng tươi của các

cây nuôi cấy trong các bình không thoáng khí cao hơn các cây nuôi cấy trong bình thoáng khí; tuy nhiên, khối lượng khô thu được lại thấp hơn (bảng 3). Khối lượng khô cao hơn của các cây nuôi cấy trong hệ thống thoáng khí có thể là do hàm lượng CO<sub>2</sub> tăng lên đã giúp cho các cây quang hợp nhiều hơn, từ đó tổng hợp nhiều các hợp chất khô hơn. Điều này cũng có thể là do trong bình nuôi cấy kín thì sự trao đổi khí giữa trong và ngoài bình nuôi cấy kém, dẫn đến độ ẩm trong bình nuôi cấy tương đối cao, làm cho cây dễ bị đọng nước và có thể dẫn đến hiện tượng thủy tinh thể. Kết quả nghiên cứu của Park (2004) cũng cho thấy một lượng lớn các chồi Khoai tây bị thủy tinh thể nuôi cấy trong các bình bị bịt kín với nồng độ ethylene cao và CO<sub>2</sub> thấp [20]. Ở cây hoa Cẩm chướng, nuôi cấy bằng các bình thoáng khí đã làm giảm hiện tượng thủy tinh thể [21].

Bảng 3. Ảnh hưởng của nuôi cấy thoáng khí lên khả năng sinh trưởng và phát triển của cây hoa Đồng tiền *in vitro*.

Chỉ tiêu theo dõi	Hệ thống nuôi cấy	
	Không thoáng khí	Thoáng khí
Khối lượng tươi (g)	2,40	1,71
Khối lượng khô (g)	0,10	0,17
Chiều cao cây (cm)	6,95	6,33
Số lượng lá	10,78	8,17
Đường kính lá (cm)	1,83	2,50
Chiều dài lá (cm)	1,92	2,41
Số lượng rễ (rễ)	3,17	2,17
Chiều dài rễ (cm)	3,99	4,59
Số lượng khí khổng (khí khổng/900 $\mu\text{m}^2$ )	24,50	12,67
Độ mở khí khổng ( $\mu\text{m}$ )	16,90	6,80

Bên cạnh đó, chiều cao của cây nuôi cấy trong bình không thoáng khí cao hơn các cây nuôi cấy trong bình thoáng khí (bảng 3, hình 1b). Kết quả này cũng tương đồng với kết quả của Mohamed và Alsadon (2009) khi nuôi cấy cây Khoai tây [22]. Goncalves và cộng sự (2007) thì lại báo cáo rằng các cây *Herreria salsaparilha* nuôi cấy trong các bình thoáng khí có chiều cao thấp hơn, ít đốt hơn, khối lượng tươi thấp hơn và khối lượng khô cao hơn so với những cây nuôi cấy trong bình không thoáng khí [23].

Trong nghiên cứu này, khi nghiên cứu hình thái giải phẫu nhận thấy ở nghiệm thức không thoáng khí thì lá có màu xanh nhạt, khí khổng chứa rất ít lục lạp; trong khi đó, ở nghiệm thức thoáng khí thì lá có màu xanh đậm, khí khổng chứa nhiều lục lạp (Hình 1b, e<sub>3</sub>, e<sub>4</sub>).

Quan sát lớp biểu bì ở mặt dưới lá dưới kính hiển vi quang học cho thấy có sự khác biệt đáng kể về số lượng khí khổng giữa các lá của các cây nuôi cấy trong bình thoáng khí và không thoáng khí. Các lá của cây nuôi cấy trong bình thoáng khí cho số lượng khí khổng (12,67 khí khổng/900  $\mu\text{m}^2$ ) thấp hơn khi nuôi cấy trong bình không thoáng khí (24,5 khí khổng/900  $\mu\text{m}^2$ ). Quan sát khí khổng của các mẫu lá sinh trưởng trong bình thoáng khí có hình elip, độ mở của khí khổng hẹp (6,8  $\mu\text{m}$ ) (bảng 3, hình 1e<sub>4</sub>). Trong khi đó, khí khổng của các mẫu lá sinh trưởng

trong bình không thoáng khí có hình cầu, độ mở khí khổng rộng (16,9  $\mu\text{m}$ ) (bảng 3, hình 1e<sub>3</sub>). Độ ẩm tương đối và lượng ethylene tích lũy trong bình nuôi cấy cao có thể gây ra sự phát triển bất thường của khí khổng và số lượng khí khổng nhiều hơn. Sha Valli và cộng sự (2003) cho rằng đối với các cây sinh trưởng *in vitro* thì khí khổng có dạng hình cầu được xem là bất thường; trong khi đó, khí khổng có hình elip được xem là bình thường [24]. Ông cũng cho rằng lá của cây *Paulownia fortunei* sinh trưởng trong điều kiện không thoáng khí cho số khí khổng đạt cao hơn so với lá sinh trưởng trong điều kiện thoáng khí.

*Khả năng sinh trưởng và phát triển của cây hoa Đồng tiền ex vitro*

Sau 4 tuần chuyển các cây *in vitro* ra điều kiện *ex vitro*, kết quả thu được cho thấy tỉ lệ sống sót của cây hoa Đồng tiền được nuôi cấy trong bình thoáng khí là 95 %; trong khi đó, các cây được nuôi cấy trong bình không thoáng khí cho tỉ lệ sống sót thấp hơn (81 %). Bên cạnh đó, khối lượng tươi, khối lượng khô, chiều cao cây, số lượng lá, đường kính lá, chiều dài lá, số lượng rễ và chiều dài rễ đạt cao hơn ở các cây có nguồn gốc từ nuôi cấy thoáng khí (bảng 4, hình 1c, d).

Bảng 4. Ảnh hưởng của nuôi cấy thoáng khí lên sự sinh trưởng và phát triển của cây hoa Đồng tiền *ex vitro*.

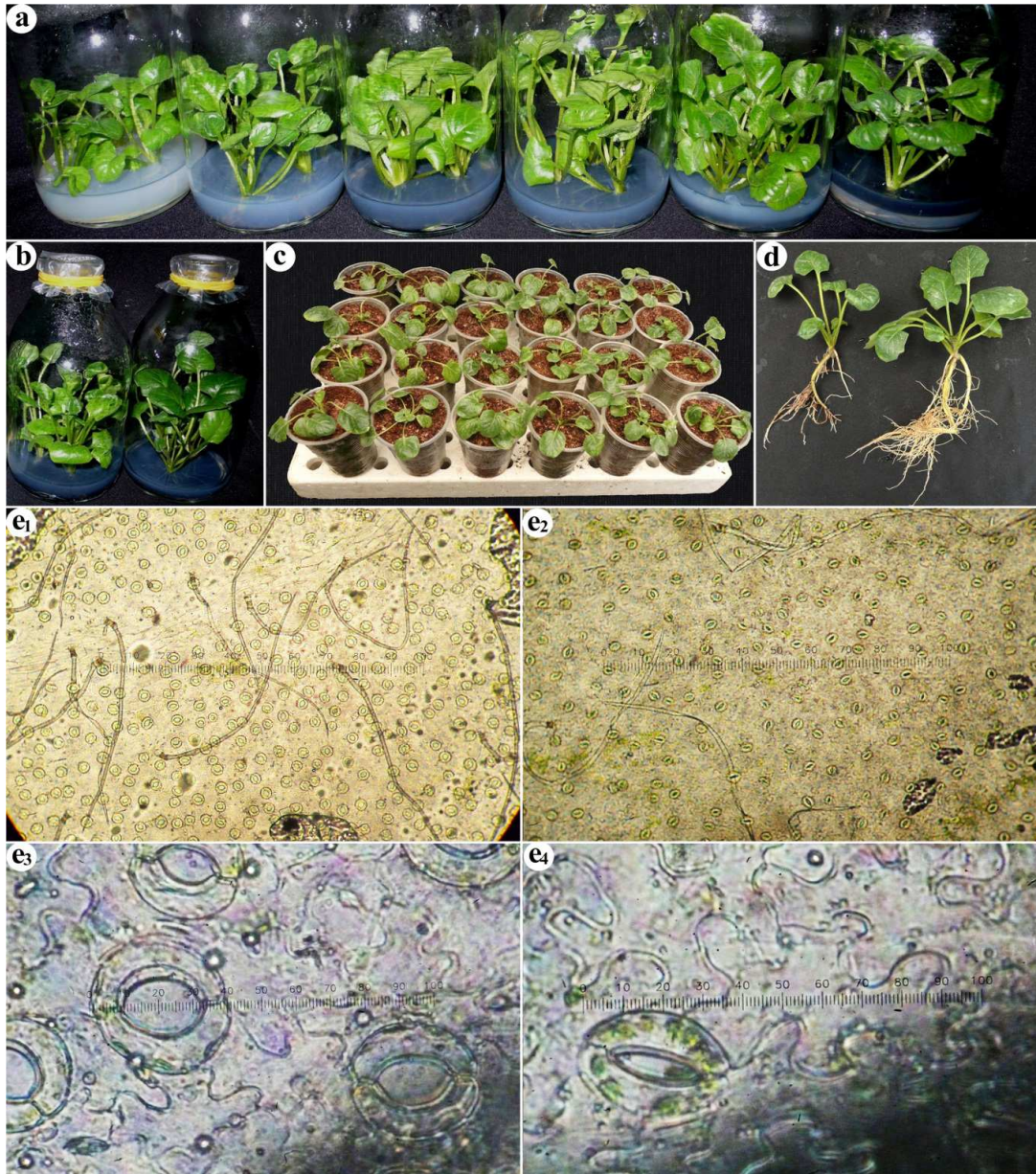
Chỉ tiêu theo dõi	Nghiệm thức	
	KTK	TK
Tỉ lệ sống sót (%)	81	95
Khối lượng tươi (g)	0,98	2,36
Khối lượng khô (g)	0,07	0,32
Chiều cao cây (cm)	6,00	6,38
Số lượng lá	5,25	8,25
Đường kính lá (cm)	2,45	2,78
Chiều dài lá (cm)	2,08	3,20
Số lượng rễ	13,25	17,75
Chiều dài rễ (cm)	9,63	16,15

Ghi chú: KTK: cây có nguồn gốc từ nuôi cấy không thoáng khí; TK: cây có nguồn gốc từ nuôi cấy thoáng khí.

Khi chuyển cây *in vitro* ra điều kiện vườn ươm hay ngoài đồng ruộng với độ ẩm thấp, cường độ ánh sáng cao và điều kiện không vô trùng gây stress cho các cây con. Do đó, không ít cây *in vitro* bị chết khi đưa ra vườn ươm. Một trong những nguyên nhân chính gây nên tỉ lệ sống sót thấp và quá trình sinh trưởng phát triển của cây *in vitro* kém trong giai đoạn *ex vitro* là do tỉ lệ quang hợp thực của cây thấp [25, 26]. Cây phát triển trong bình độ thoáng khí kém thường có khí khổng hoạt động không bình thường và lớp cutin trên bề mặt lá rất mỏng. Môi trường *in vitro* có độ ẩm cao (> 95 %), vì vậy khí khổng của cây phải mở để duy trì áp suất cân bằng với áp suất xung quanh [27, 28], kết quả là khí khổng hoạt động không bình thường. Khi chuyển ra cây ra vườn ươm độ ẩm giảm, khí khổng vẫn mở trong điều kiện *ex vitro*, do vậy cần phải duy trì độ ẩm cao để giảm lượng nước mất qua khí khổng cho đến khi cây hồi phục khả năng quang hợp



[28, 26]. Bên cạnh đó sự tích lũy ethylene trong bình nuôi cấy cũng ảnh hưởng đến tỉ lệ sống sót của cây trong điều kiện *ex vitro* [29].



**Hình 1.** Ảnh hưởng của AC và nuôi cấy thoáng khí lên sự sinh trưởng và phát triển của cây hoa Đồng tiền *in vitro* và *ex vitro*. **a.** Cây hoa Đồng tiền sinh trưởng và phát triển trên môi trường MS bổ sung 0; 0,5; 1,0; 2,0; 0/1 và 1/0 g/l AC (từ trái sang phải); **b.** Cây hoa Đồng tiền nuôi cấy trong bình kín và bình thoáng khí (từ trái sang phải); **c.** Cây hoa Đồng tiền trồng ngoài vườn ươm; **d.** Cây hoa Đồng tiền nuôi cấy trong bình kín và bình thoáng khí sau 4 tuần trồng ngoài vườn ươm (từ trái sang phải); **e<sub>1</sub>, e<sub>2</sub>.** Số lượng khí khổng của lá cây hoa Đồng tiền nuôi cấy trong bình kín và bình thoáng khí (số khí khổng/900  $\mu\text{m}^2$  lá), quan sát ở vật kính  $\times 40$  (từ trái sang phải); **e<sub>3</sub>, e<sub>4</sub>.** Độ mở khí khổng của lá cây hoa Đồng tiền nuôi cấy trong bình kín và bình thoáng khí, quan sát ở vật kính  $\times 100$  (từ trái sang phải).

Độ ẩm trong bình nuôi cấy thoáng khí giảm làm gia tăng tỉ lệ thoát hơi nước của cây, khí không hoạt động bình thường. Vì vậy, rễ phát triển tốt hơn. Cây không bị mất nước nhiều khi chuyển ra điều kiện vườn ươm, kết quả là lá không bị héo và cây phát triển nhanh trong điều kiện *ex vitro* [29].

Như vậy, hệ thống nuôi cấy thoáng khí phù hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của các cây hoa Đồng tiền *in vitro* và *ex vitro*. Hệ thống này có thể được sử dụng trong vi nhân giống cây hoa Đồng tiền trên quy mô thương mại.

#### 4. KẾT LUẬN

Nồng độ AC tối ưu cho giai đoạn tạo rễ cây hoa Đồng tiền *in vitro* là 1,0 g/l. Hệ thống nuôi cấy thoáng khí nâng cao sự sinh trưởng và phát triển của các cây hoa Đồng tiền *in vitro*. Bên cạnh đó, cây hoa Đồng tiền nuôi cấy trong điều kiện thoáng khí cho tỉ lệ sống sót đạt 95 % và sinh trưởng, phát triển tốt ở giai đoạn *ex vitro*. Kết quả nghiên cứu này có thể áp dụng vào việc vi nhân giống thương mại cây hoa Đồng tiền trên quy mô lớn.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jeong B. R., Fujiwara K., and Kozai T. - Environmental control and photoautotrophic micropropagation, *Hortic. Rev.* **17** (1995) 129-172.
2. Pan M. J. and Staden van J. - The use of charcoal in *in vitro* culture: review, *Plant Growth Regul.* **26** (1998) 155-163.
3. Webb D. T., Flinn B. S., and Georgis W. - Micropropagation of eastern white pine (*Pinus strobus* L.), *Can. J. For. Res.* **18** (1988) 1570-1580.
4. Dumas E. and Monteuis O. - *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants – influence of activated charcoal, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **40** (1995) 231-235.
5. Horner M., McComb J. A., and Street H. E. - Ethylene production and plantlet formation by *Nicotiana* anthers cultured in the presence and absence of charcoal, *Exp. Bot.* **28** (3) (1977) 1365-1372.
6. Schloupt R. M. - Plant regeneration *in vitro*, characterization and control of vitrification and somaclonal variation in onion (*Allium cepa* L.), PhD Thesis, University Ill., Urbana, Ill., 1994, p. 128.
7. Kozai T. and Jeong B. R. - Environmental control in plant tissue culture and its application for micropropagation, In: Hashimoto Y., Bot G. P. A., Day W., Tantau H. J., and Nonami H. (eds.), *The computerized greenhouse: automatic control application in plant production*, Academic, New York, 1993, pp. 95-116.
8. Tanaka M., Fujiwara K., and Kozai T. - Effects of relative humidity in the culture vessel on the transpiration and net photosynthetic rates of potato plantlets *in vitro*, *Acta Hortic.* **319** (1992) 59-64.
9. Dillen W. and Buysens S. - A simple technique to overcome vitrification in *Gypsophila paniculata* L., *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **19** (1989) 181-188.
10. Hakkaart F. A. and Versluijs J. A. - Some factors affecting glassiness in carnation meristem tip cultures, *Neth. J. Plant Pathol.* **89** (1983) 47-53.

11. Kozai T. and Sekimoto K. - Effects of the number of air changes per hour of the closed vessel and the photosynthetic photon flux on the growth of strawberry plantlets *in vitro*, *Environ. Contr. Biol.* **26** (1988) 21-29.
12. Tanaka M. - Disposable film culture vessels, In: Bajaj. Y. P. S. (ed.), *Biotechnology in agriculture and forestry 17, High-tech and micropropagation I*, 1991, pp. 213-238.
13. Deproft M. P., Maene L., and Debergh P. - Carbon dioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of magnolia culture *in vitro*, *Physiol. Plant* **65** (1985) 375-379.
14. Nhut D. T. - *In vitro* growth and physiological aspects of some horticultural plantlets cultured under red and blue light - emitting diodes (LEDs), *Dortoral Thesis*, Kagawa University, 2002.
15. Murashige T. and Skoog F. - A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant* **15** (1962) 473-479.
16. Duncan D. B. - Multiple range and multiple F test, *Biometrics* **11** (1955) 1-42.
17. Szule P. and Rogozinska J. - Effect of auxins and activated charcoal on rooting of gerbera *in vitro*, *Zeszyty-Probleowe-Postepow-Nauk-Rolniczych* **414** (1994) 371-377.
18. Wann S. R., Veazey R. L., and Kaphammer J. - Activated charcoal does not catalyze sucrose hydrolysis in tissue culture media during autoclaving, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **50** (1997) 221-224.
19. Kataeva N. V., Alexandrova I. G., Butenko R. G., and Dragavtceva E. V. - Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **14** (1991) 31-40.
20. Park S. W., Jeon J. H., Kim H. S., Park Y. M., Aswath C., and Joung H. - Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on hyperhydricity of potato shoots *in vitro*, *Sci. Hortic.* **99** (2004) 199-205.
21. Jo M. H., Ham I. K., Lee A. M., Lee M. E., Song H. N., Han N. G., and Woo S. I. - Effect of sealing materials and photosynthetic photon flux of culture vessel on growth and vitrification in carnation plantlets *in vitro*, *J. Korean Soc. Hortic. Sci.* **43** (2002) 133-136.
22. Mohamed M. A. H. and Alsadon A. A. - Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets, *Sci. Hortic.* **123** (2010) 295-300.
23. Goncalves L. A., Geraldine R. M., Picoli E. A. T., Vendrame W. A., de Carvalho C. R., and Otoni W. C. - *In vitro* propagation of *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae) as affected by different sealing materials and gaseous exchanges, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **92** (2007) 243-250.
24. Sha Valli K. P. S., Kozai T., Nguyen Q. T., Kubota C., and Dhawan V. - Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions, *Biol. Plant* **46** (2003) 161-166.
25. Grout B. W. W. and Donkin M. E. - Photosynthetic activity of cauliflower meristem cultures *in vitro* and at transplanting into soil, *Acta Hortic.* **212** (1987) 323-327.
26. Preece J. E. and Sutter E. G. - Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field, In: Debergh P. C. and Zimmermann R. H. (eds.), *Micropropagation: technology and application*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1991, pp. 71-91.

27. Losch R. and Tenhanen J. D. - Stomatal response to humidity-phenomenon and mechanism, in stomatal physiology, In: Jarvis P. G. and Mansfield T. A. (ed.), Stomatal physiology, Cambridge University Press, New York, 1981, pp. 137-161.
28. Shackel K. A., Novello V., and Sutler E. G. - Stomatal fuction and cuticular conductance in whole tissue cultured apple plants, J. Hortic. Sci. **115** (1990) 468-472.
29. Zobayed S. M. A., Afreen F., and Kozai Y. - Quality biomass production via photoautotrophic micropropagation, Acta Hortic. **530** (2000) 377-386.

### ABSTRACT

#### EFFECT OF ACTIVATED CHARCOAL AND VENTILATION CULTURE ON GROWTH AND DEVELOPMENT OF *GERBERA JAMESONII* *IN VITRO* AND *EX VITRO*

Nguyen Thi Kim Yen, Nguyen Phuc Huy, Hoang Van Cuong, Nguyen Thi Nhat Linh, Nguyen Ba Nam, Vu Quoc Luan, Duong Tan Nhut\*

*Tay Nguyen Institute of Biology, Vietnam Academy of Science and Technology,  
116 Xo Viet Nghe Tinh, Dalat, Lam Dong, Vietnam*

\*Email: [duongtannhut@gmail.com](mailto:duongtannhut@gmail.com)

*Gerbera* (*Gerbera jamesonii*) is one of flower of high economic value and popularity cultural in many countries all over the world. *Gerbera* is very popular used as pot flower, cut flower or as a decorative garden. The requirements for micropropagation of *Gerbera* are improving the system and culture medium in order to enhance the quality of *in vitro* flowers and respond seedling provision on a large-scale. In this study, the effect of activated charcoal and ventilation culture on growth and development of *Gerbera in vitro* and *ex vitro* stage were investigated. The results showed that shoots grown and developed well when cultured on MS medium containing 30 g/l sucrose, 9 g/l agar and 1 g/l activated charcoal in ventilation culture. However, the position of AC medium layer had little effect on the growth and development of *Gerbera in vitro*. Plantlets cultured on MS medium supplemented with 1.0 g/l AC in ventilation culture transferred to greenhouse gave a very high survival rate of 95 %.

*Keywords:* activated charcoal, *ex vitro*, *Gerbera jamesonii*, *in vitro*, ventilation culture.