IN VITRO SELECTION OF *Chrysanthemum × morifolium* FOR SALT TOLERANCE

La Viet Hong[1*], Le Hoang Duc[2], Chu Duc Ha[3], Cao Phi Bang[4], Phung Thi Ha[5]
[1]*Hanoi Pedagogical University N°2,* [2]*Institute of Biotechnology - VAST*
[3]*University of Engineering and Technology - Vietnam National University Hanoi*
[4]*Hung Vuong University,* [5]*The Yenlang High school - Hanoi*

ARTICLE INFO

Received: 02/5/2021
Revised: 28/7/2021
Published: 31/7/2021

KEYWORDS

Chrysanthemum
Selection
Salt tolerance
Chrysanthemum× morifolium
Genetic diversity

ABSTRACT

The chrysanthemum is one of the most widely cultivated plants and also one of the most important ornamental plants in the world. In this study, we established a systematic regeneration directly adventitous shoots from the leaf segments of chrysanthemum, then determined the concentration of NaCl as a direct selective factor for the adventitous shoots, and finally analyzed the genetic diversity of some selected clones by ISSR-PCR analysis. The results showed that the most suitable medium for the adventitous shoot regeneration from leaf explants in chrysanthemum was MS, 30 g/l sucrose, 7 g/l agar, pH 5.8, supplemented with 0.5 mg/l BAP. After 5 cultured weeks, the number of shoots per explants, the number of leaves per shoot and the length of shoot were 4.37 (shoots/explant), 4.25 (amount of leaves/shoot) and 1.96 (cm), respectively. The medium for direct selection of salinity-tolerant *in vitro* shoots was the adventitous shoot regeneration medium supplemented with 100 mM NaCl. The 873 primer [5 '- $(GACA)_4$ -3'] was suitable for analyzing the genetic relationships of selected chrysanthemum lines. By ISSR-PCR analysis, the following five selective chrysanthemum lines (D1-D5) showed the genetic diversity. These chrysanthemum lines are potential materials for more analysis of salinity tolerance.

CHỌN LỌC *IN VITRO* MỘT SỐ DÒNG CÚC ĐẠI ĐÓA (*Chrysanthemum × morifolium*) CHỊU MẶN

La Việt Hồng[1*], Lê Hoàng Đức[2], Chu Đức Hà[3], Cao Phi Bằng[4], Phùng Thị Hà[5]
[1]*Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2,* [2]*Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,*
[3]*Trường Đại học Công nghệ - Đại học Quốc gia Hà Nội,*
[4]*Trường Đại học Hùng Vương,* [5]*Trường THPT Yên Lãng - Hà Nội*

THÔNG TIN BÀI BÁO

Ngày nhận bài: 02/5/2021
Ngày hoàn thiện: 28/7/2021
Ngày đăng: 31/7/2021

TỪ KHÓA

Hoa cúc
Chọn lọc
Chịu mặn
Đại đóa
Đa dạng di truyền

TÓM TẮT

Cây hoa cúc là một trong những cây được trồng rộng rãi và cũng là một trong những loại hoa cây cảnh quan trọng nhất trên thế giới. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thiết lập hệ thống tái sinh chồi bất định từ mảnh là cây hoa cúc đại đóa, sau đó xác định nồng độ NaCl làm áp lực chọn lọc trực tiếp chồi bất định, đồng thời phân tích sự đa dạng di truyền của các dòng sau chọn lọc được thực hiện bằng ISSR-PCR. Kết quả cho thấy, môi trường phù hợp nhất để tái sinh chồi bất định từ mảnh lá ở cúc đại đóa là MS, đường 30 g/l sucrose, 7 g/l agar, pH 5,8, bổ sung 0,5 mg/l BAP. Sau 5 tuần nuôi cấy, số chồi/mẫu, số lá/chồi và chiều cao chồi lần lượt là 4,37 (chồi/mẫu); 4,25 (lá/chồi) và 1,96 (cm). Môi trường để chọn lọc trực tiếp chồi *in vitro* chịu mặn là môi trường tái sinh chồi bất định có bổ sung muối NaCl 100 mM. Mồi ISSR 873 [5'-$(GACA)_4$-3'] là phù hợp để phân tích mối quan hệ di truyền các dòng cúc sau chọn lọc. Bằng phân tích ISSR-PCR, năm dòng cúc sau chọn lọc (D1-D5) thể hiện sự đa dạng di truyền. Những dòng cúc này là nguyên liệu tốt cho các phân tích tiếp theo về tính chịu mặn.

DOI: https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4445

* Corresponding author. *Email: laviethong.sp2@gmail.com*

1. Giới thiệu

Xâm nhập mặn là một trong những yếu tố bất lợi gây tác động rất nghiêm trọng cho các đối tượng cây trồng, trong đó có cây hoa cúc (*Chrysanthemum* × *morifolium*) [1]. Đây là loại cây hoa có giá trị kinh tế cao, được trồng rộng rãi ở hầu hết các vùng sinh thái [2]. Hiện nay, biến đổi khí hậu đang là thách thức với nhân loại, là nguyên nhân trực tiếp gây ra sự xâm nhập mặn, dẫn đến diện tích đất canh tác bị thu hẹp, làm sụt giảm năng suất và chất lượng cây trồng nói chung bao gồm cây hoa cúc. Chính vì vậy, sử dụng giống hoa cúc chịu mặn là một trong những phương pháp thích hợp nhất để có thể canh tác tốt và mở rộng diện tích trồng.

Phương pháp nuôi cấy mô kết hợp chọn lọc *in vitro* giúp xác định một cách chính xác các dòng cúc có khả năng chịu mặn. Cách tiếp cận này đã được ứng dụng thành công trên nhiều đối tượng cây, điển hình như lúa gạo (*Oryza sativa*) [3], mía (*Saccharum officinarum*) [4] và khoai tây (*Solanum tuberosum*) [5]. Trên đối tượng cây hoa cúc, tác giả Hossain et al. (2007) đã tiến hành chọn lọc các dòng cúc chịu mặn thông qua chọn lọc các dòng callus trên môi trường nuôi cấy bổ sung NaCl, sau đó tái sinh chồi. Tuy nhiên, quá trình chọn lọc diễn ra khá dài (3 tháng), môi trường nuôi cấy phức tạp [6]. Kỹ thuật sàng lọc *in vitro* được tiến hành dựa trên thí nghiệm nuôi cấy mô sẹo, phôi vô tính hoặc chồi trên môi trường dinh dưỡng có xử lý bất lợi, từ đó có thể lựa chọn được các dòng biến dị đồng nhất, sạch bệnh và phù hợp tính trạng chống chịu cần cải tiến [7].

Mục đích của nghiên cứu này nhằm chọn lọc *in vitro* các dòng cúc có khả năng chịu mặn. Trước hết, quy trình tái sinh chồi bất định từ mẫu lá cây hoa cúc đã được tiến hành. Sau đó, mẫu chồi được xử lý trong môi trường tái sinh có bổ sung NaCl ở các nồng độ khác nhau. Các mẫu sàng lọc được kiểm tra mức độ đa dạng di truyền bằng kỹ thuật PCR sử dụng chỉ thị ISSR (PCR-ISSR). Kết quả của nghiên cứu này đã cung cấp những dẫn liệu khoa học quan trọng cho việc phát triển các dòng cúc chịu mặn phục vụ sản xuất tại những vùng chịu ảnh hưởng của xâm nhập mặn.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cây cúc đại đóa *in vitro* được lưu giữ tại Phòng thí nghiệm Sinh lý học thực vật, Khoa Sinh - Kĩ thuật Nông nghiệp, trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2. Môi trường nuôi cấy là MS cơ bản (Murashige và Skoog) [8], gồm các 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-napthalene acetic acid (NAA) (Dulchefa, Hà Lan).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tái sinh chồi bất định từ mảnh lá

Sử dụng lá cây cúc *in vitro* 30 ngày tuổi, cấy lên môi trường MS (pH 5,8) [7], 7 g/l agar, 30 g/l sucrose, bổ sung BAP có nồng độ khác nhau: 0,00; 0,25; 0,50; 0,75 (mg/l). Quan sát hình thái lá, chồi dưới kính hiển vi (Primo star, Carlzeiss, Đức) ở thời điểm 2, 3, 4 và 5 tuần. Đo các chỉ tiêu số chồi/mẫu, số lá/chồi và chiều cao chồi (cm) sau 5 tuần nuôi cấy.

2.2.2. Chọn lọc trực tiếp dòng cúc chịu mặn

Sau khi thiết lập được hệ thống tái sinh, chồi cúc được chọn lọc trực tiếp dựa theo nghiên cứu trước đây [8] có cải tiến. Cụ thể, mảnh lá cây cúc *in vitro* 30 ngày tuổi được nuôi cấy lên môi trường tái sinh chồi bất định từ mảnh lá: MS, 7 g/l agar, 30 g/l sucrose, BAP 0,50 mg/l bổ sung NaCl với các nồng độ khác nhau: 0; 50; 75; 100; 125 (mM). Các chỉ tiêu chính bao gồm số chồi/mẫu, số lá/chồi, chiều cao chồi (cm), tổng số chồi (dòng) sau năm tuần thí nghiệm. Các dòng sau chọn lọc tiếp tục được cấy chuyền lên môi trường có bổ sung NaCl 100 mM, cuối cùng lựa chọn năm dòng cho phân tích tiếp theo.

2.2.3. Phân tích mối quan hệ di truyền các dòng cúc sau chọn lọc bằng kỹ thuật ISSR-PCR

ADN tổng số từ mẫu hoa cúc *in vitro* được tách chiết bằng phương pháp CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) [9]. Sau đó, các mẫu ADN được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR với các cặp mồi ISSR với thể tích 10µl bao gồm nước cất vô trùng, PCR buffer 10X, dNTP 2 mM, 2,5 mM primer (kí hiệu: ISSR 873: 5'-$(GACA)_4$ -3' [10, 11]), Taq polymerase 5U/µl và ADN 40 ng/µl. Kỹ thuật ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) được thực hiện qua 40 chu kỳ gia nhiệt trên máy PCR GeneAmp PCR System 2700 như sau: 5 phút ở 94°C, 40 chu kỳ gồm 30 giây ở 94°C, 30 giây ở 45°C và 40 giây ở 72°C và cuối cùng là 7 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR được bảo quản ở 4°C, sau đó được điện di kiểm tra bằng gel agarose 0,8% (w/v) trong đệm TAE 1X trên hệ thống điện di BioRad. Sau đó, gel được nhuộm với dung dịch ethidium bromide trong 10 phút và chụp hình dưới đèn UV. Các đoạn ADN khuếch đại được ghi nhận và phân tích. Quá trình phân tích đa dạng di truyền dựa trên kĩ thuật ISSR-PCR. Số liệu phân tích ISSR-PCR được xử lí bằng phần mềm PyElph 1.4 [12], các băng vạch sáng rõ và ổn định được ghi điểm 1, không có băng vạch ghi điểm 0. Cây phân loại được xây dựng bằng phần mềm NTSYSpc 2.1 [13].

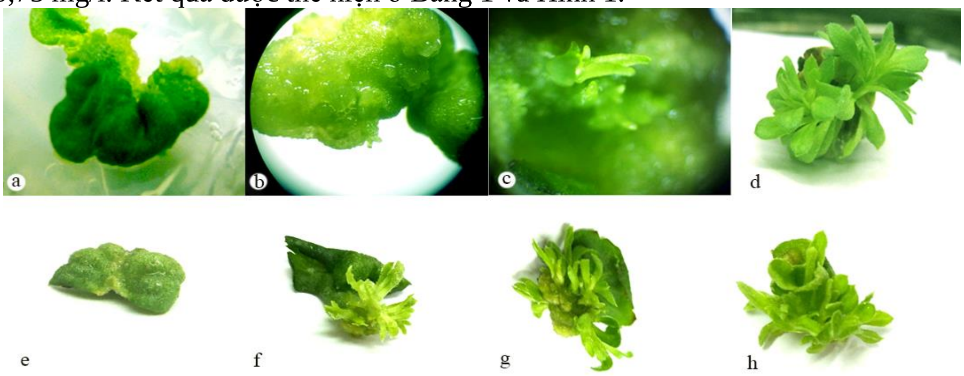
2.2.4. Phân tích thống kê

Các thí nghiệm tái sinh sinh chồi bất định, chọn lọc *in vitro* trực tiếp dòng cúc chịu mặn được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần nhắc lại. Số liệu tái sinh được phân tích theo các tham số thống kê: giá trị trung bình, độ lệch chuẩn bằng chương trình Excel [14]. So sánh giữa các giá trị trung bình bằng thuật toán giới hạn sai khác nhỏ nhất $LSD_{0,05}$.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tái sinh chồi bất định từ mảnh lá cây hoa cúc

Mẫu lá cúc đại đóa được nuôi dưỡng trên môi trường MS có bổ sung BAP nồng độ thí nghiệm từ 0,0- 0,75 mg/l. Kết quả được thể hiện ở Bảng 1 và Hình 1.



Hình 1. *Hình ảnh tái sinh chồi bất định*
a. Mẫu lá nuôi cấy sau 2 tuần, b-c: chồi tái sinh sau 3-4 tuần nuôi cấy dưới kính hiển vi (100X), d. Cụm chồi bất định sau 5 tuần nuôi cấy; e-h: chồi bất định tái sinh trên môi trường bổ sung BAP 0,0; 0,25; 0,50; 0,75 (mg/l).

Bảng 1. *Ảnh hưởng của BAP đến sự tái sinh chồi bất định của cây cúc đại đóa sau 5 tuần nuôi cấy*

Nồng độ BAP (mg/l)	Số chồi/mẫu	Số lá/chồi	Chiều cao chồi (cm)
B0,00	$0,00 \pm 0,00^c$	$0,00 \pm 0,00^c$	$0,00 \pm 0,00^d$
B0,25	$1,37 \pm 0,70^b$	$2,25 \pm 0,43^b$	$1,05 \pm 0,16^b$
B0,50	$4,37 \pm 0,48^a$	$4,25 \pm 0,97^a$	$1,96 \pm 0,24^a$
B0,75	$1,25 \pm 0,43^b$	$1,87 \pm 0,60^b$	$0,87 \pm 0,13^c$
$LSD_{0.05}$	*0,52*	*0,66*	*0,17*

Chú thích: trong cùng một cột, ký tự theo sau khác nhau a, b, c... thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với α=0,05

Kết quả cho thấy, sau 2 tuần nuôi cấy, tại vị trí mảnh lá tiếp xúc với môi trường nuôi cấy có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng có sự tăng sinh rõ rệt, hình thành mô sẹo. Ở thời điểm 3-4 tuần, chồi hình thành rõ rệt. BAP là chất điều hòa có ảnh hưởng tích cực đến quá trình tái sinh chồi thể hiện ở các công thức, số chồi/mẫu dao động từ 1,25 - 4,37. Tuy nhiên, công thức bổ sung BAP nồng độ 0,50 mg/l là phù hợp nhất, số chồi/mẫu, số lá/chồi và chiều cao chồi là tốt nhất so với các công thức còn lại, lần lượt là 4,37 (chồi/mẫu); 4,25 (lá/chồi) và 1,96 (cm). Theo nghiên cứu trước đây, tái sinh chồi bất định từ mẫu lá thường được thực hiện bằng cách bổ sung auxin kết hợp với cytokinin, cụ thể nồng độ auxin cao hơn so cytokinin, sẽ tốt cho quá trình tái sinh chồi. Theo Kazeroonian *et al* (2018), sử dụng 4,5 mg/l BAP kết hợp 1,0 mg/l NAA, chồi được tái sinh trực tiếp từ mảnh lá, cho số chồi trung bình/mẫu đạt 2,06 chồi/mẫu sau 7 tuần [15], trong khi nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, môi trường tái sinh chồi trực tiếp từ lá khá đơn giản, chỉ cần bổ sung BAP 0,50 mg/l, chồi được tái sinh trực tiếp từ mảnh lá sau 5 tuần và cao hơn.

3.2. Chọn lọc trực tiếp dòng hoa cúc chịu mặn (NaCl) trên môi trường nuôi cấy in vitro

Mẫu lá cúc được nuôi trên công thức đối chứng BM0 (MS, BAP 0,5 mg/l, NaCl 0 mM - không có yếu tố chọn lọc) và các môi trường BM khác (MS, BAP 0,5 mg/l, NaCl dao động từ 50 - 125 mM) cho kết quả khác nhau rõ rệt về số chồi tái sinh (thể hiện ở Bảng 2 và Hình 2).

Hình 2. *Hình ảnh chồi bất định trên môi trường bổ sung NaCl*
S0 - 0 mM, S1 - 50 mM, S2 - 75 mM, S3 - 100mM, S4 - 125mM

Bảng 2. *Kết quả chọn lọc chồi in vitro một số dòng hoa cúc chịu mặn (sau 5 tuần nuôi cấy)*

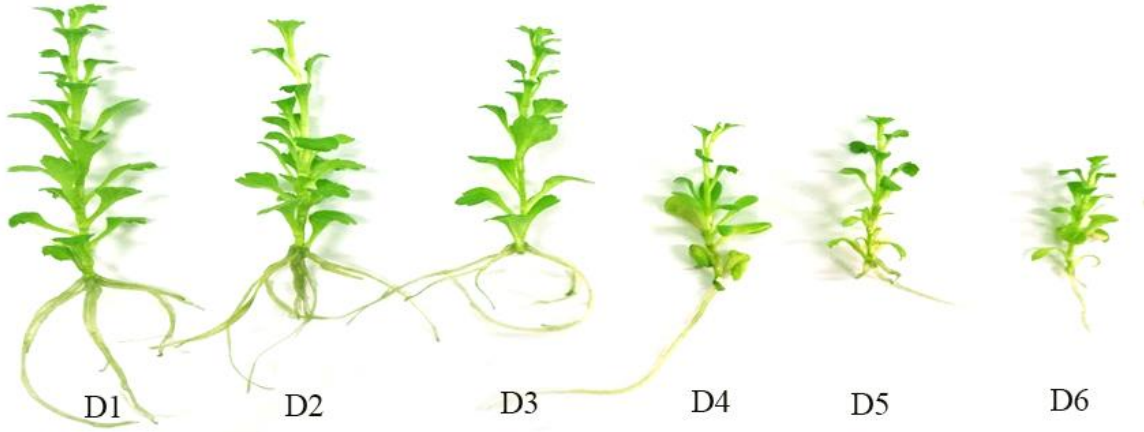
Nồng độ NaCl (mM)	Số chồi/mẫu	Số lá/chồi	Chiều cao chồi	Tổng số chồi (dòng)
0	4,50 ± 0,71^a	4,37 ± 0,48^a	2,25 ± 0,19^a	36
50	2,62 ± 0,70^b	3,37 ± 0,48^b	1,92 ± 0,22^b	21
75	2,37 ± 0,48^{bc}	3,25 ± 0,43^b	1,86 ± 0,15^b	19
100	1,87 ± 0,78^c	3,00 ± 0,50^b	1,85 ± 0,19^b	16
125	0,62 ± 0,48^d	1,00 ± 0,87^c	0,52 ± 0,42^c	02
$LSD_{0,05}$	*0,67*	*0,60*	*0,27*	-

Chú thích: trong cùng một cột, ký tự theo sau khác nhau a, b, c... thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với α=0,05

Phân tích cho thấy, ở công thức đối chứng - không bổ sung NaCl, số chồi/mẫu là 4,50, số lá/chồi là 4,37 và chiều cao chồi là 2,25 (cm), các chỉ tiêu này là cao nhất so với các công thức còn lại. Ngược lại, các chỉ tiêu này thấp nhất ở công thức có bổ sung NaCl 125 mM. Ở công thức bổ sung 100 mM NaCl, số chồi/mẫu, số lá/chồi và chiều cao chồi (cm) đạt tương ứng là 2,00; 2,87 và 1,81. Theo Hossain *et al.* (2007), chọn lọc dòng chịu NaCl được thực hiện bằng quá trình phát sinh cơ quan trên môi trường tái sinh khá phức tạp chứa đồng thời TDZ, NAA và GA3 [5]. Kết quả này của chúng tôi chứng tỏ có thể tái sinh chồi cúc đại đóa với nồng độ muối cao nhất ở môi trường có bổ sung 100 mM NaCl, 16 dòng cúc sống sót trên môi trường tái sinh được sử dụng cho phân tích tiếp theo.

3.3. Phân tích đa dạng di truyền một số dòng cúc sau chọn lọc in vitro bằng kỹ thuật ISSR-PCR

Phân tích các trình tự đơn giản lặp lại trong hệ gen - ISSR được sử dụng rộng rãi để đánh giá sự đa dạng di truyền giữa các chủng/giống trong tập đoàn giống cây trồng, Phân tích này dựa trên kỹ thuật PCR, có ưu điểm đơn giản, nhanh chóng, không cần biết rõ các trình tự để thiết kế primer. Các chỉ thị dựa trên sự lặp lại của AG, GA và $(GATA)_n$ rất hiệu quả trong phân tích quan hệ di truyền ở nguồn gen cây lúa [11]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chọn 5 trong 16 dòng sau chọn lọc và 1 dòng đối chứng (không qua chọn lọc) được cấy lên môi trường MS, NAA 0,1 và NaCl 100 mM (Hình 3) để thu mẫu lá tách chiết ADN làm khuôn cho phản ứng PCR. Trong phản ứng ISSR-PCR, chúng tôi có sử dụng 5 chỉ thị (mồi): ISSR 53, ISSR 57, ISSR 826, ISSR 866 và ISSR 873. Khi tiến hành điện di, chúng tôi thu được kết quả rõ nhất và đa dạng nhất khi sử dụng chỉ thị ISSR 873. Kết quả thể hiện ở Bảng 3.

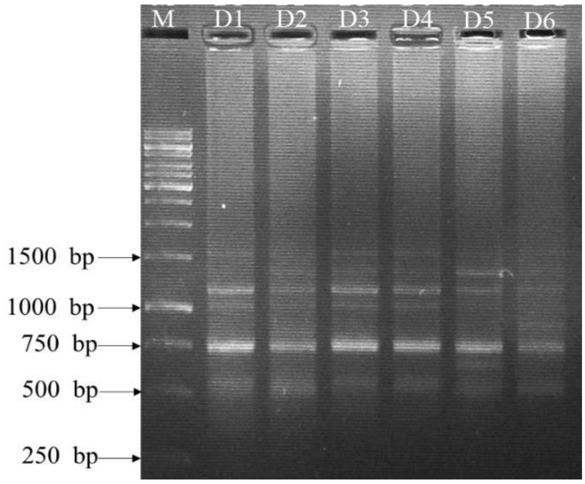


Hình 3. *Các dòng cúc sau chọn lọc in vitro được phân tích đa dạng di truyền*
D1, D2, D3, D4, D5: các dòng cúc đã qua chọn lọc in vitro và D6: dòng đối chứng (ĐC)

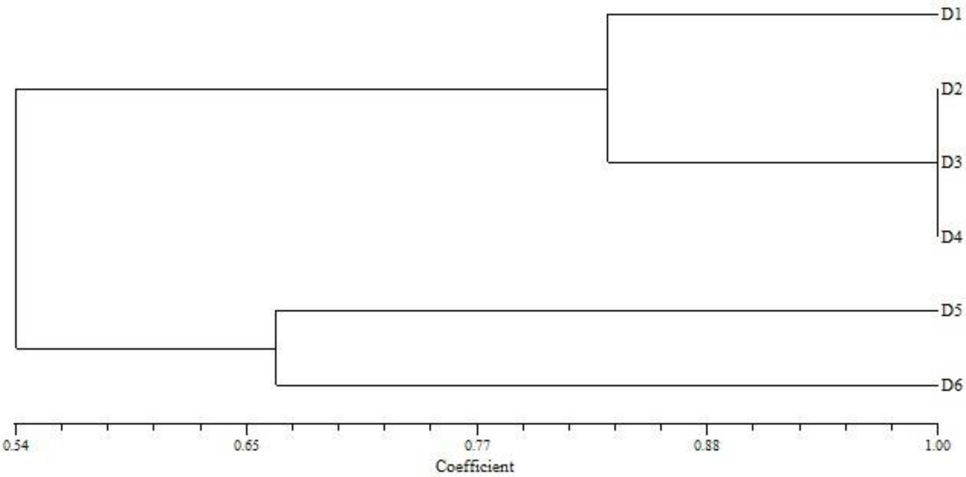
Bảng 3. *Kết quả phân tích gel bằng phần mềm PyElph 1.4*

Số thứ tự băng \ Dòng	D1	D2	D3	D4	D5	D6
1	1^+	1^+	1^+	1^+	0	0
2	0	1^+	1^+	1^+	1^+	1^{+++}
3	1^{+++}	1^{++}	1^{+++}	1^{++}	1^+	1^{++}
4	1^+	1^+	1^+	1^+	0	0
5	1^{+++}	1^{++}	1^{+++}	1^{+++}	1^+	1^{++}
6	1^{++}	1^{++}	1^+	1^+	1^+	1^+
Tổng	**5**	**6**	**6**	**6**	**4**	**4**

(Ghi chú: có băng sáng 1, không có băng sáng 0, băng đậm + + +, băng vừa + +, băng nhạt +)



Hình 4. *Ảnh điện di sản phẩm PCR của các dòng cúc với mồi ISSR 873. M: Thang chuẩn ADN 1 kb (Thermo Scientific); D1-D5: các dòng cúc đã qua chọn lọc in vitro, D6: Dòng đối chứng*



Hình 5. *Cây phả hệ thể hiện mối quan hệ di truyền giữa các dòng cúc dựa trên kết quả sản phẩm ISSR. D1-D5: các dòng cúc sau chọn lọc, D6: Dòng đối chứng*

Tiếp tục phân tích mối quan hệ di truyền của 5 dòng cúc sau chọn lọc và 1 dòng đối chứng dựa trên kết quả phân tích bản gel điện di sản phẩm ISSR-PCR, kết quả được thể hiện trên sơ đồ Hình 4 và 5. Kết quả cho thấy, các dòng cúc chọn lọc có sự đa dạng về mặt di truyền, 6 dòng được phân chia thành 2 nhóm chính: Nhóm 1 gồm hai dòng D1, D2, D3 và D4; Nhóm 2 gồm hai dòng D5 và D6 (ĐC). Kết quả này cho thấy đa số các dòng cúc được chọn lọc là khác nhóm so với đối chứng, điều này thể hiện có sự khác biệt, đa dạng về mặt di truyền giữa dòng đã qua chọn lọc và dòng đối chứng. Kết quả này chứng tỏ rằng dưới áp lực chọn lọc là NaCl 100 mM, chồi tái sinh thể hiện sự đa dạng về quan hệ di truyền, tạo ra nguồn nguyên liệu cho quá trình chọn lọc.

4. Kết luận

Môi trường phù hợp nhất để tái sinh chồi bất định từ mảnh lá ở cúc đại đóa là MS, đường sucrose 30 g/l, agar 7 g/l, pH 5,8, bổ sung BAP 0,5 mg/l (môi trường B0,5), sau 5 tuần nuôi cấy, số chồi/mẫu, số lá/chồi và chiều cao chồi lần lượt là 4,37 (chồi/mẫu); 4,25 (lá/chồi) và 1,96 (cm). Chọn lọc trực tiếp chồi *in vitro* chịu mặn được thực hiện bằng nuôi cấy trên môi trường tái sinh chồi bất định có bổ sung muối 100 mM NaCl. Mồi ISSR 873 [5'-$(GACA)_4$ -3'] là phù hợp để phân tích mối quan hệ di truyền các dòng cúc sau chọn lọc. Bằng kĩ thuật ISSR-PCR, năm dòng cúc sau chọn lọc (D1 - D5) chịu mặn thuộc hai nhóm khác nhau, chỉ duy nhất dòng D5 xếp cùng nhóm với dòng đối chứng D6. Những dòng cúc này là nguyên liệu tốt cho các phân tích tiếp theo về tính chịu mặn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

[1] R. Vanlal, "Effect of saline stress on growth and biochemical indices of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) germplasm," *Indian Journal of Agricultural Sciences*, vol. 89, no. 1, pp. 41-45, 2019.

[2] J. Su, J. Jiang, F. Zhang, Y. Liu, L. Ding, S. Chen, and F Chen, "Current achievements and future prospects in the genetic breeding of chrysanthemum: A review," *Horticulture Research*, vol. 6, no. 109, pp. 1-10, 2019.

[3] R. Subramaniam and P. Arumugam, "*In vitro* screening for salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.)," *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences*, no. 17, pp. 91-95, 2015.

[4] A. A. Nikam, R. M. Devarumath, and M. G. Shitole, "Gamma radiation, *in vitro* selection for salt (NaCl) tolerance, and characterization of mutants in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.)," *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, vol. 50, pp. 766-776, 2014.

[5] H. A. A Ahmed, N. K. Şahin, G. Akdoğan, C. Yaman, D. Köm, and S. Uranbey, "Variability in salinity stress tolerance of potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties using *in vitro* screening," *Ciência e Agrotecnologi*, vol. 44, pp. e004220, 2020.
[6] Z. Hossain, A. K. Mandal, S. K. Datta, and A. K. Biswas, "Development of NaCl-tolerant line in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. through shoot organogenesis of selected callus line," *Journal of Biotechnology*, vol. 129, no. 4, pp. 658-667, 2007.
[7] M. K. Rai, R. K. Kalia, R. Singh, M. P. Gangola, and A. K. Dhawan, "Developing stress tolerant plants through in vitro selection–An overview of the recent progress," *Environmental and Experimental Botany*, vol. 71, no. 1, pp. 89-98, 2011.
[8] T. Murashige and F. Skoog, "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures," *Physiologia Plantarum*, vol. 15, no. 3, pp. 473-497, 1962.
[9] A. Healey, A. Furtado, T. Cooper, and R. J. Henry, "Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species," *Plant Methods*, vol. 10, p. 21, 2014.
[10] N. T. Le, H. P. Nguyen, T. D. Mai, T. B. Thai, T. T. Nguyen, D. V. B. Le, K. Q. Nguyen, and N. Q. N. Phan, "Genetic diversity investigation and molecular markers establishment for identification of several initially selective avocado (*Persea americana* Miller) strains in Lam Dong province," *Journal of Sciences - Da Lat University*, vol. 6, no. 4, pp. 1-14, 2016.
[11] N. Sarla, C. N. Neeraja, and E. A. Siddiq, "Use of anchored $(AG)_n$ and $(GA)_n$ primers to assess genetic diversity of Indian landraces and varieties of rice," *Current Sciences*, vol. 89, pp. 1371-1381, 2005.
[12] A. B. Pavel and C. I. Vasile, "PyElph, a software tool for gel images analysis and phylogenetics," *BMC Bioinformatics*, vol. 13, p. 9, 2012.
[13] S. Jamshidi, "NTSYSpc 2.02e Implementation in molecular biodata analysis (clustering, screening, and individual selection)," *International Conference on Environmental and Computer Science*, vol. 19, pp. 165-169, 2011.
[14] V. M. Nguyen, V. H. La, and X. P. Ong, Methods in plant physiology. *Vietnam National University Press*, Hanoi, 2013.
[15] R. Kazeroonian, A Mousavi, S. K. Jari, and M. Tohidfar, “Factors Influencing *in vitro* Organogenesis of *Chrysanthemum morifolium cv*. ‘Resomee Splendid,” *Iranian J Biotech*, vol. 16, no. 2, pp. 132-139, 2018.