

NHÂN NHANH *in vitro* CÂY KIM CHÂM (*Hemerocallis fulva*) TAM BỘỊ TỪ CÁC BỘ PHẬN CỦA HOA

Nguyễn Xuân Trường¹, Đồng Huy Giới², Phạm Thị Minh Phương^{3*}

¹Viện Sinh học Nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: phamthiminhphuong@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 29.06.2022

Ngày chấp nhận đăng: 28.05.2024

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu là chọn được nguồn vật liệu và chất điều tiết sinh trưởng tối ưu nhất để xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cây hoa kim châm tam bộị. Thí nghiệm được tiến hành với các nguồn mẫu (đế hoa, cánh hoa, bao phấn, chỉ nhị), cũng như chất điều tiết sinh trưởng BA (N6-benzyladenine), 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) và α -NAA (α -naphthaleneacetic acid). Kết quả nghiên cứu cho thấy, cánh hoa là nguồn mẫu tối ưu và hiệu quả nhất để đưa vào nuôi cấy, tỷ lệ tạo callus đạt 83,3% trên môi trường MS (Murashige and Skoog) có bổ sung 2 mg/l 2,4-D và 10 mg/l BA. Môi trường MS có bổ sung 2 mg/l BA kết hợp 0,25 mg/l α -NAA cho hệ số nhân chồi cao nhất (12,9 chồi). Môi trường MS có bổ sung 0,3 g/l than hoạt tính là tốt nhất cho chồi ra rễ (5,8 rễ/chồi). Kết quả cũng cho thấy độ bộị của cây tái sinh từ cánh hoa không thay đổi so với cây mẹ ($3x = 33$). Cây tái sinh ra hoa sau 11 tháng trồng. Số lượng hoa, màu hoa, cũng như chiều dài và chiều rộng cánh hoa tương tự như hoa của cây mẹ.

Từ khóa: *Hemerocallis fulva*, kim châm, nhiễm sắc thể.

In vitro Micropropagation of Triploid Daylily (*Hemerocallis Fulva*) using Parts of Flower

ABSTRACT

The purpose of this study was to find out an optimal sample and plant growth regulators for developing an *in vitro* rapid propagation procedure of triploid daylily. The experiments were conducted on the different explants (flower base, petals, anthers and filaments), also plant growth regulators BA (N6-benzyladenine), 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) và α -NAA (α -naphthaleneacetic acid). The research results showed that petals were the optimal and most effective explant source for culture. The callus induction rate of 83.3% was achieved on MS medium (Murashige and Skoog) supplemented with 2 mg/l 2,4-D and 10 mg/l BA. MS medium supplemented with 2 mg/l BA and 0.25 mg/l α -NAA gave the highest shoot multiplication (12.9 shoots). MS medium supplemented with 0.3 g/l activated carbon was the best for rooting induction (5.8 roots/bud). The results also showed that the ploidy level of the regenerated plants was similar to the donor plant ($3x = 33$). The plant bloomed after 11 months of planting. Flower number, color of flower, as well as length and width of flower petals were similar to those of donor plant.

Keywords: *Hemerocallis fulva*, triploid daylily, *in vitro* rapid propagation.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây kim châm (*Hemerocallis fulva*) còn được gọi là huyền thảo, hoa hiên, hay rau huyền thuộc họ *Hemerocallidaceae* là cây thân thảo có rễ củ, sống lưu niên, có nguồn gốc từ các nước Đông Bắc Á, Bắc Ấn Độ (Mlcek & Rop, 2011).

Cây kim châm được sử dụng trong trang trí cảnh quan do cây có sự đa dạng về màu sắc và thời gian nở hoa, bên cạnh đó nó cũng được dùng như là một loại rau ăn hàng ngày của con người hoặc làm thuốc (Eman & cs., 2022).

Hầu hết kim châm trong tự nhiên là lưỡng bộị ($2n = 22$) (Plodeck, 2002), ở thể tam bộị là rất

hiếm và chỉ được hình thành do đột biến tự phát (Matsuoka, 1971). Cây tam bội ($3n = 33$) có hoa to hơn, màu sắc đa dạng hơn, số lượng hoa nhiều hơn và thân cây to hơn so với các cây lưỡng bội (Zhang & cs., 2014). Do cây tam bội không có khả năng sinh sản hữu tính, nên chỉ có thể nhân giống bằng phương pháp nhân giống truyền thống là tách nhánh (Gulia, 2009), tuy nhiên hệ số nhân giống rất thấp (Phạm Thị Minh Phượng & Nguyễn Anh Đức, 2018). Hiện nay phương pháp nhân giống *in vitro* được áp dụng rộng rãi để có thể tạo được cây con sạch bệnh trong thời gian với hệ số nhân và đồng nhất. Các nghiên cứu về nhân nhanh cây kim châm trong nuôi cấy mô trước đây đã gặt hái được nhiều thành công, tuy nhiên các nghiên cứu mới chỉ tập trung vào loại nhị bội. Vật liệu cho nuôi cấy mô rất đa dạng có thể là chồi đỉnh (Nguyễn Thị Lâm Hải & cs., 2016), mô thân (Kanyand & cs., 2020), nụ hoa (Kanyand & cs., 2013), chỉ nhị (Gulia & cs., 2009), chồi hoa (Adelberg & cs., 2007) hoặc lá bắc (Kanyand & cs., 2021a). Chính vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục đích xây dựng quy trình nhân nhanh *in vitro* cây kim châm tam bội đạt hiệu quả tốt nhất.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu giống kim châm tam bội được lấy từ vườn tập đoàn hoa kim châm của Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Nguồn

mẫu đưa vào nuôi cấy gồm: đế hoa, cánh hoa, chỉ nhị và bao phấn (Hình 1B) ở các kích thước khác nhau của nụ hoa: 1: < 2cm; 2: 2-5cm; 3: 5-7cm; 4: > 7cm (Hình 1A).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tạo vật liệu khởi đầu

Nụ hoa sau khi lấy từ cây mẹ được rửa dưới vòi nước sạch và được làm khô bằng giấy thấm trước khi đưa mẫu vào khử trùng. Phương pháp khử trùng mẫu được tiến hành theo Kanyand & cs. (2021b). Nụ hoa được tách rời thành từng bộ phận (Hình 1B), cánh hoa được cắt theo chiều dọc sau đó cắt ngang thành miếng có độ lớn 0,5cm, các bộ phận khác (đế hoa, chỉ nhị, bao phấn) được giữ nguyên. Mẫu được cấy vào môi trường MS có bổ sung 2,4-D với 3 nồng độ (1 mg/l, 2 mg/l và 3 mg/l) kết hợp với BA ở 3 nồng độ (5 mg/l, 10 mg/l và 15 mg/l) và nuôi cấy ở điều kiện tối hoàn toàn trong 8 tuần.

2.2.2. Tái sinh và nhân nhanh chồi

Để tái sinh và nhân nhanh chồi, mẫu callus được vào môi trường MS có bổ sung 2 mg/l BA kết hợp với α -NAA ở 3 nồng độ (0,25 mg/l; 0,5 mg/l và 0,75 mg/l).

2.2.3. Tạo cây hoàn chỉnh

Chồi có chiều cao 3-4cm và có 2-3 lá được cấy vào môi trường MS có bổ sung than hoạt tính ở 3 nồng độ (0,1 g/l, 0,3 g/l, 0,5 g/l).



Chú thích: A: Kích thước của nụ hoa (1: < 2cm; 2: 2-5cm; 3: 5-7cm; 4: > 7cm); B: Mẫu đưa vào nuôi cấy (1: Cánh hoa; 2: bao phấn; 3: đế hoa).

Hình 1. Nguồn vật liệu nghiên cứu

2.2.4. Kiểm tra nhiễm sắc thể ở cây tái sinh

Số lượng nhiễm sắc thể được đếm từ tế bào mô phân sinh của đầu rễ (Östergren & Heneen, 1962). Đầu rễ được thu thập từ cây mẹ và 20 cây con tái sinh trồng trong vườn ươm, thời gian lấy rễ từ 8h-9h sáng. Đầu rễ (1-2cm) được xử lý trong dung dịch colchicine 0,2% ở 4°C trong 24h và cố định trong dung dịch ethanol/acetic theo tỷ lệ 3:1 tại nhiệt độ phòng trong 24h. Các mẫu rễ được ngâm trong dung dịch ethanol 70% và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng. Đầu rễ được ngâm trong dung dịch enzyme (0,3% cellulose + 0,2% macerozyme + 0,1% pectolyase + 1mM ethylene diamine tetra-acetic acid; pH 4,0) ở 37°C trong 30 phút, rửa sạch bằng nước cất vô trùng. Sau đó đầu rễ được nhuộm bằng dung dịch 1% (w/v) aceto-carmin. Ít nhất 10 tế bào/mẫu có nhiễm sắc thể phân tách rõ ràng được đếm số lượng và lưu hình ảnh bằng kính hiển vi phản pha ở độ phóng đại 100X (Eclipse, E400, Nikon, Japan).

2.2.5. Bố trí thí nghiệm

Môi trường nuôi cấy nên là môi trường MS có bổ sung 2% đường và 0,45% agar. Môi trường nghiên cứu có bổ sung hoặc không bổ sung các chất điều tiết sinh trưởng. pH của môi trường được điều chỉnh về 5,8 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1,1 atm trong 20 phút. Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi công thức 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 30 mẫu/công thức.

Đối với thí nghiệm tạo callus, mẫu được nuôi cấy trong tối hoàn toàn ở nhiệt độ 22-25°C và độ ẩm 60% trong 8 tuần.

Đối với thí nghiệm tái sinh chồi và tạo cây hoàn chỉnh, mẫu được nuôi cấy ở nhiệt độ 22-25°C và 16 giờ sáng/8 giờ tối, cường độ ánh sáng 2.500-3.000lux, độ ẩm 60%.

Các chỉ tiêu (tỷ lệ mẫu tạo callus, hệ số nhân, chiều cao cây, số lá, tỷ lệ chồi ra rễ, số rễ, chiều dài rễ) được quan sát và thu thập từ 4 tuần đến 8 tuần sau nuôi cấy. Các chỉ tiêu sinh trưởng phát triển và chất lượng hoa của cây tái sinh được thu thập khi cây nở hoa.

2.2.6. Xử lý số liệu

Số liệu được phân tích phương sai (ANOVA) một nhân tố bằng phần mềm thống kê SAS 9.3 (2013). Sự sai khác giữa các giá trị trung bình được kiểm tra bằng phép ước lượng và sử dụng tiêu chuẩn LSD (Least Significant Difference) ở độ tin cậy 95%. Độ biến động của thí nghiệm được thể hiện qua chỉ số CV% (coefficient of variation). Kiểm định Student's t-test được sử dụng để so sánh giữa cây mẹ và cây tái sinh.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của tổ hợp 2,4-D và BA tới khả năng tạo callus từ các bộ phận khác nhau của hoa kim châm

Việc lựa chọn mẫu cấy là bước quan trọng nhất trong quá trình nuôi cấy mô thực vật. Các mẫu khác nhau cho kết quả cảm ứng tạo callus khác nhau. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá khả năng tạo callus của các bộ phận hoa trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau. Kết quả được thể hiện ở bảng 1, bảng 2, bảng 3 và bảng 4.

Kích thước của nụ hoa có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tạo callus của đế hoa, ở kích thước nụ hoa (< 2cm) hoặc (> 7cm) tỷ lệ đế hoa tạo callus là 0%, trong khi đó tỷ lệ này đạt từ 3,3-86,7% ở kích thước nụ từ 2-7cm. Số liệu ở bảng 1 cũng cho thấy chất điều tiết sinh trưởng có ảnh hưởng quyết định đến khả năng tạo callus. Việc kết hợp giữa 2,4-D và BA ở các nồng độ khác nhau cho tỷ lệ tạo callus khác nhau, ở công thức bổ sung 2 mg/l 2,4-D + 5 mg/l BA đế hoa tạo callus đạt 86,7% so với công thức đối chứng đạt 0%, callus dạng khối chặt, màu vàng nhạt (Bảng 1, Hình 2A). Kanyand & cs. (2013) đã chỉ ra rằng khi 2,4-D và BA cùng có mặt trong môi trường MS làm tăng khả năng tạo callus của lá và nụ hoa so với việc riêng từng chất hoặc không có, điều này tương tự với kết quả nghiên cứu của chúng tôi.

Số liệu ở bảng 2 cho thấy: kích thước nụ hoa càng lớn thì khả năng tạo callus từ cánh hoa càng giảm. Mẫu cánh hoa thu từ nụ hoa có kích thước dưới 2cm cho tỷ lệ tạo callus cao nhất (83,3%) cũng như cho chất lượng callus tốt hơn

các kích thước còn lại ngoại trừ công thức đối chứng. Tất cả các giai đoạn của cánh hoa đều cho tỷ lệ tạo callus cao khi nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2 mg/l 2,4-D và 10 mg/l BA (Hình 2B). Kết quả của nghiên cứu này cũng tương tự với công bố của Kanyan & cs. (2013) khi nuôi cấy nụ hoa và hoa của 4 giống hoa kim

châm, tỷ lệ tạo callus > 80%, callus có chất lượng tốt. Khi nghiên cứu về khả năng tạo callus và tái sinh từ các bộ phận khác nhau của cây hoa cúc, Wei & cs. (2014) cho biết mẫu từ cánh hoa không những dễ khử trùng hơn, tỷ lệ nhiễm thấp hơn, mà còn có tỷ lệ tái sinh cao, đồng thời mẫu có ít virus hơn.

Bảng 1. Ảnh hưởng của tổ hợp 2,4-D và BA tới khả năng tạo callus từ đế hoa
(sau 8 tuần nuôi cấy)

Chất điều tiết sinh trưởng (mg/l)		Kích thước của hoa (cm)							
2,4-D	BA	< 2		2-5		5-7		> 7	
		Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)	Chất lượng callus	Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)	Chất lượng callus	Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)	Chất lượng callus	Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)	Chất lượng callus
ĐC	0,0	0,0	-	0,0	-	0,0	-	0,0	-
1,0	5,0	0,0	-	6,7	-	3,3	++	0,0	-
1,0	10,0	0,0	-	3,3	-	16,7	++	0,0	-
1,0	15,0	0,0	-	0,0	-	6,7	++	0,0	-
2,0	5,0	0,0	-	30,0	-	86,7	+++	0,0	-
2,0	10,0	0,0	-	13,3	-	66,7	+++	0,0	-
2,0	15,0	0,0	-	3,3	-	43,3	++	0,0	-
3,0	5,0	0,0	-	10,0	-	40,0	+++	0,0	-
3,0	10,0	0,0	-	3,3	-	36,7	++	0,0	-
3,0	15,0	0,0	-	0,0	-	13,3	+	0,0	-

Chú thích: ĐC: Đối chứng; -: Không phát sinh callus; +: Callus liên kết lỏng lẻo, mềm, màu trắng; ++: Callus không đồng đều, màu trắng; +++: Callus đồng đều liên kết chặt, màu vàng nhạt.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tổ hợp 2,4-D và BA tới khả năng tạo callus từ cánh hoa
(sau 8 tuần nuôi cấy)

Chất điều tiết sinh trưởng (mg/l)		Kích thước của hoa (cm)							
2,4-D	BA	< 2		2-5		5-7		> 7	
		Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)	Chất lượng callus	Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)	Chất lượng callus	Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)	Chất lượng callus	Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)	Chất lượng callus
ĐC	0,0	0,0	-	0,0	-	0,0	-	0,0	-
1,0	5,0	13,3	++	10,0	++	0,0	-	0,0	-
1,0	10,0	30,0	+++	26,7	+++	6,7	++	0,0	-
1,0	15,0	43,3	+++	40,0	+++	13,3	++	0,0	-
2,0	5,0	46,7	+++	43,3	+++	20,0	++	3,3	++
2,0	10,0	83,3	+++	53,3	+++	26,7	+++	10,0	++
2,0	15,0	63,3	+++	36,7	+++	10,0	++	0,0	-
3,0	5,0	26,7	++	20,0	++	3,3	++	0,0	-
3,0	10,0	16,7	++	13,3	++	0,0	-	0,0	-
3,0	15,0	3,3	++	0,0	-	0,0	-	0,0	-

Chú thích: ĐC: Đối chứng; -: Không phát sinh callus; +: Callus liên kết lỏng lẻo, mềm, màu trắng; ++: Callus không đồng đều, màu trắng; +++: Callus đồng đều liên kết chặt, màu vàng nhạt.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tổ hợp 2,4-D và BA tới khả năng tạo callus từ bao phấn (sau 8 tuần nuôi cấy)

Chất điều tiết sinh trưởng (mg/l)		Kích thước của hoa (cm)							
		< 2		2-5		5-7		> 7	
2,4-D	BA	Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)	Chất lượng callus	Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)	Chất lượng callus	Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)	Chất lượng callus	Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)	Chất lượng callus
ĐC	0,0	0,0	-	0,0	-	0,0	-	0,0	-
1,0	5,0	53,3	++	13,3	++	0,0	-	0,0	-
1,0	10,0	23,3	++	3,3	++	0,0	-	0,0	-
1,0	15,0	6,7	++	0,0	-	0,0	-	0,0	-
2,0	5,0	3,3	++	0,0	-	0,0	-	0,0	-
2,0	10,0	0,0	-	0,0	-	0,0	-	0,0	-
2,0	15,0	0,0	-	0,0	-	0,0	-	0,0	-
3,0	5,0	0,0	-	0,0	-	0,0	-	0,0	-
3,0	10,0	0,0	-	0,0	-	0,0	-	0,0	-
3,0	15,0	0,0	-	0,0	-	0,0	-	0,0	-

Chú thích: ĐC: Đối chứng; -: Không phát sinh callus; +: Callus liên kết lỏng lẻo, mềm, màu trắng; ++: Callus không đồng đều, màu trắng; +++: Callus đồng đều liên kết chặt, màu vàng nhạt.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy chất điều tiết sinh trưởng cũng như kích thước của nụ hoa mang tính quyết định đến sự tạo callus từ bao phấn. Ở công thức không có chất điều tiết sinh trưởng (công thức đối chứng) hoặc nồng độ chất điều tiết sinh trưởng cao thì callus không được hình thành. Bao phấn cũng không tạo callus khi nụ hoa có kích thước > 5cm, callus chỉ được hình thành khi nụ hoa có kích thước < 2cm và 2-5cm, tỷ lệ tạo callus đạt từ 3,3 đến 53,3%, callus có dạng khối chặt màu trắng (Hình 2C). Kích thước của nụ hoa < 2cm được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 1 mg/l 2,4-D và 15 mg/l BA cho tỷ lệ tạo callus cao nhất (53,3%).

Các nghiên cứu về nuôi cấy bao phấn trên cây cà chua cho thấy có mối tương quan giữa kích thước của nụ hoa đến sự tạo callus của bao phấn (Segui-Simarro & Nuez, 2007; Kumar & cs., 2019). Nụ hoa có kích thước từ 2-5mm tốt nhất cho bao phấn tạo callus và sự phát triển của callus, trong khi nụ hoa có kích thước > 7mm (lúc này nụ hoa chuẩn bị nở) thì tỷ lệ tạo callus của bao phấn rất thấp. Các tác giả kết luận rằng kích thước của nụ hoa thực sự có liên quan đến sự giai đoạn phát triển của hạt phấn. Hạt phấn ở giai đoạn cuối không nhân đến trước 2 nhân thì bao

phấn sẽ có tỷ lệ tạo callus cao nhất. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy tỷ lệ tạo callus của bao phấn có liên quan đến kích thước của nụ hoa. Tuy nhiên để đánh giá mối tương quan giữa giai đoạn phát triển của hạt phấn với kích thước của nụ hoa kim châm tam bội cần có những nghiên cứu tiếp theo.

Mẫu chỉ nhị thu ở nụ hoa có kích thước < 2cm và 2-5cm tạo callus trên môi trường bổ sung 2,4-D và BA với nồng độ lần lượt là: 1 mg/l 2,4-D + 5,0 mg/l BA; 2,0 mg/l 2,4-D + 5,0 mg/l; 10,0 mg/l; 15,0 mg/l BA và 3,0 mg/l 2,4-D + 15,0 mg/l BA. Ở các nồng độ còn lại chỉ nhị không tạo callus. Chỉ nhị thu từ nụ hoa có kích thước > 5cm không tạo callus trên tất cả các công thức thí nghiệm. Trên môi trường bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D và 15,0 mg/l BA, chỉ nhị được lấy từ nụ hoa có kích thước 2-5cm cho tỷ lệ tạo callus cao nhất (đạt 63,3%) với khả năng sinh trưởng tốt (Bảng 4), callus dạng hạt, màu vàng ngả xanh (Hình 2D).

Qua kết quả trong bảng 1, 2, 3 và 4 có thể thấy môi trường nuôi cấy và kích thước nụ hoa của mẫu nuôi cấy có ảnh hưởng rõ ràng đến sự hình thành callus. Để hoa thu từ nụ hoa có kích thước từ > 7cm có thể tạo callus, nhưng cánh

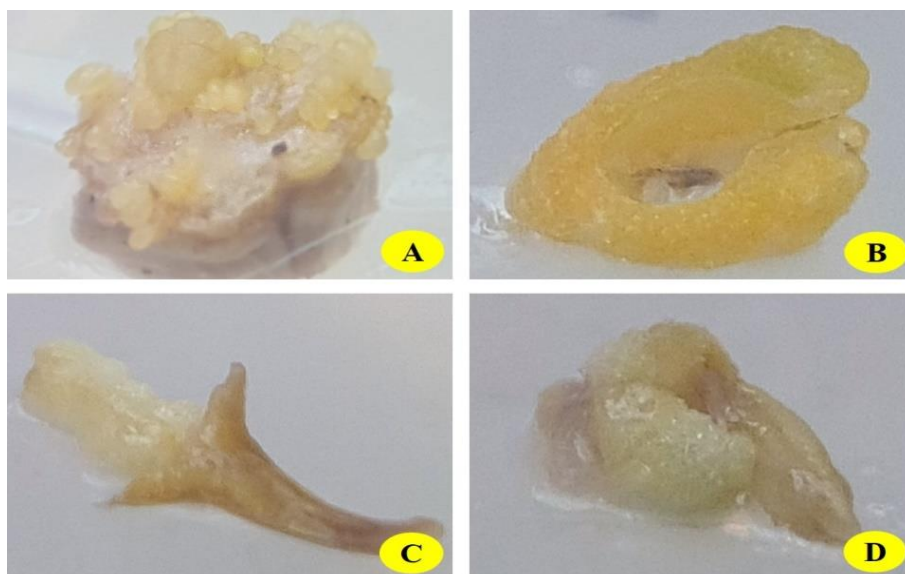
hoa chỉ có thể tạo callus khi nụ hoa có kích thước < 5cm. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi có sự khác biệt với nghiên cứu của Meyer (1976) khi tác giả tạo callus thành công từ nuôi cấy lát cắt của hoa kim châm từ bội có kích thước > 10cm. Sự khác biệt có thể do độ bội của cây hoặc do khác loài. Tuy nhiên, Shi & cs. (2021)

lại cho rằng sự tạo callus thuận lợi khi cánh hoa của cây mẫu đơn được nuôi cấy ở giai đoạn còn non. Việc tạo callus của cây dưa chuột và cây ớt thuận lợi khi bao phấn và chỉ nhị khi thu từ mẫu nụ hoa có kích thước < 5cm, nhưng bao phấn kén môi trường nuôi cấy hơn so với chỉ nhị (Trần Khắc Thi & cs., 2010).

Bảng 4. Ảnh hưởng của tổ hợp 2,4-D và BA tới khả năng tạo callus từ chỉ nhị
(sau 8 tuần nuôi cấy)

Chất điều tiết sinh trưởng (mg/l)		Kích thước của hoa (cm)							
		< 2		2-5		5-7		> 7	
2,4-D	BA	Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)	Chất lượng callus	Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)	Chất lượng callus	Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)	Chất lượng callus	Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)	Chất lượng callus
ĐC	0,0	0,0	-	0,0	-	0,0	-	0,0	-
1,0	5,0	3,3	++	30,0	++	0,0	-	0,0	-
1,0	10,0	13,3	++	40,0	+++	0,0	-	0,0	-
1,0	15,0	36,7	+++	63,3	++++	0,0	-	0,0	-
2,0	5,0	3,3	++	13,3	++	0,0	-	0,0	-
2,0	10,0	6,7	++	23,3	++	0,0	-	0,0	-
2,0	15,0	13,3	++	46,7	+++	0,0	-	0,0	-
3,0	5,0	0,0	-	0,0	-	0,0	-	0,0	-
3,0	10,0	0,0	-	0,0	-	0,0	-	0,0	-
3,0	15,0	6,7	++	20,0	++	0,0	-	0,0	-

Chú thích: ĐC: Đối chứng; -: Không phát sinh callus; +: Callus liên kết lỏng lẻo, mềm, màu trắng; ++: Callus không đồng đều, màu trắng; +++: Callus đồng đều liên kết chặt, màu vàng nhạt.



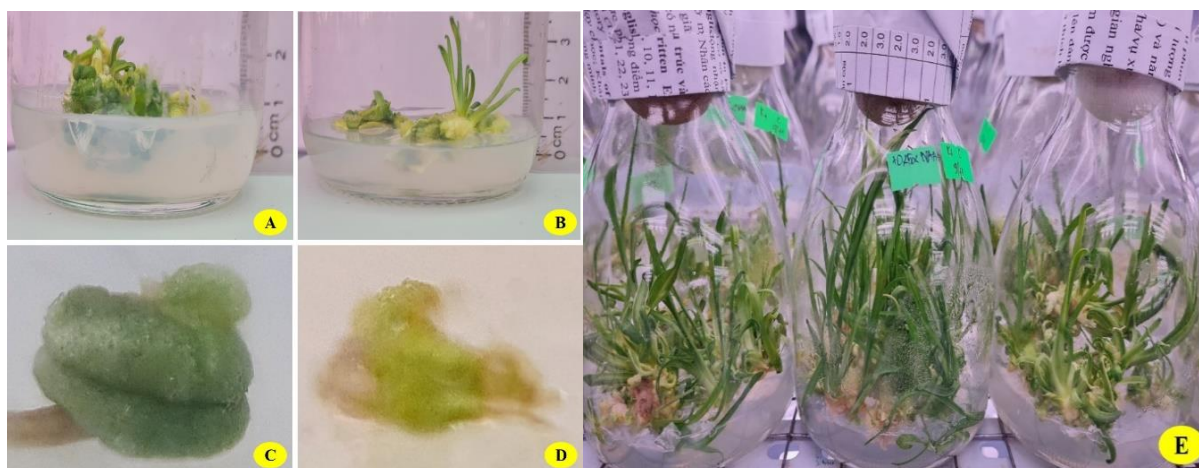
Ghi chú: A: Đế hoa; B: Cánh hoa; C: Bao phấn; D: Chỉ nhị ở kích thước nụ hoa < 5cm trong điều kiện tối.

Hình 2. Sự tạo callus tạo từ các bộ phận khác nhau (sau 8 tuần)

Bảng 5. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và α -NAA tới khả năng tái sinh chồi từ callus

Nguồn mẫu	Chất điều tiết sinh trưởng (mg/l)		Số chồi (chồi/callus)
	BA	α -NAA	
Callus tái sinh từ đế hoa	2,0	0,0	0,0
	2,0	0,25	8,2 ^d
	2,0	0,5	4,6 ^c
	2,0	0,75	2,2 ^b
	CV (%)		2,8
	LSD _(0,05)		0,2
Callus tái sinh từ cánh hoa	2,0	0,0	0,0 ^a
	2,0	0,25	12,9 ^d
	2,0	0,5	7,4 ^c
	2,0	0,75	3,1 ^b
	CV (%)		1,9
	LSD _(0,05)		0,2
Callus tái sinh từ chỉ nhị	2,0	0,0	0,0
	2,0	0,25	0,0
	2,0	0,5	0,0
	2,0	0,75	0,0
Callus tái sinh từ bao phấn	2,0	0,0	0,0
	2,0	0,25	0,0
	2,0	0,5	0,0
	2,0	0,75	0,0

Chú thích: Trên cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau với $P < 0,05$.



Ghi chú: A: Đế hoa; B: Cánh hoa; C: Bao phấn; D: Chỉ nhị; E: chồi phát triển.

Hình 3. Sự tái sinh chồi của các mẫu (sau 4 tuần)

3.2. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và α -NAA tới khả năng tái sinh chồi từ callus

Kết quả đánh giá tác động BA và α -NAA ở các nồng độ khác đến sự tái sinh chồi từ nguồn

mẫu callus khác nhau (đế hoa, cánh hoa, bao phấn và chỉ nhị) được trình bày ở bảng 5. Callus hình thành từ cánh hoa và đế hoa phát sinh chồi trên môi trường bổ sung 2 mg/l BA và α -NAA (0,25 mg/l; 0,5 mg/l; 0,75 mg/l), trong khi

đó callus hình thành từ chỉ nhị và bao phấn không phát sinh chồi. Trên cùng một công thức thí nghiệm thì callus hình thành từ cánh hoa tái sinh chồi nhiều hơn callus hình thành từ đế hoa. Tuy nhiên, callus hình thành từ cánh hoa kim châm tam bội trong môi trường bổ sung 2 mg/l BA và 0,25 mg/l α -NAA phát sinh ra nhiều chồi nhất (12,9 chồi/mẫu) và có khả năng sinh trưởng tốt. Khi nồng độ α -NAA tăng kết hợp với 2 mg/l BA đã làm giảm số lượng chồi (Bảng 5, Hình 3).

Nghiên cứu của Kanyand & cs. (2020) trên cây hoa kim châm và Wu & cs. (2023) trên cây hoa cúc, cho thấy việc sử dụng kết hợp giữa BA và α -NAA đem lại sự tái sinh chồi từ callus cao hơn so với sử dụng riêng rẽ. Hơn thế nữa Meyer (1979) cho rằng nếu nồng độ α -NAA vượt ngưỡng 0,5 mg/l cũng sẽ làm giảm sự tạo chồi của cây hoa kim châm, cho dù α -NAA đứng riêng rẽ hoặc kết hợp với BA. Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của chúng tôi.

So sánh khả năng tái sinh chồi từ các mẫu khác, chúng tôi thấy hệ số nhân chồi từ cánh hoa (12,5 chồi/mẫu), cao hơn 50% so với đế hoa và 100% so với chỉ nhị và bao phấn. Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự các nghiên cứu nhân nhanh *in vitro* trên cây hoa mẫu đơn (Xia & cs., 2022), trên cây kim châm tứ bội (Meyer, 1976). Việc cây có thể hoặc không thể tái sinh từ callus của chỉ nhị và bao phấn có liên quan đến chất lượng của callus, thông thường cây không thể tái sinh khi callus có màu vàng sẫm hoặc màu nâu (Kumar & cs., 2020). Tuy nhiên trong nghiên cứu của chúng tôi, callus vẫn có chất lượng tốt

(Hình 3C và 3D) nhưng sự tái sinh chồi không xảy, điều này có thể do môi trường nuôi cấy hoặc bổ sung chất điều tiết chưa phù hợp. Vì vậy cần phải có những nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến ra rễ của cây kim châm tái sinh

Kết quả đánh giá tác động của than hoạt tính đến sự ra rễ của chồi được thể hiện ở bảng 6 và hình 4.

Sau 4 tuần, sự ra rễ của hoa kim châm tương đối dễ dàng khi chỉ cần nuôi cấy chồi trên môi trường MS (đối chứng), tỷ lệ ra rễ đạt hơn 80%. Tuy nhiên chiều cao cây, số lá/cây, chiều dài rễ, số rễ trên cây lại có sự khác biệt đáng kể so với các công thức có bổ sung than hoạt tính. Công thức bổ sung 0,3 g/l than hoạt tính cho chất lượng cây tốt nhất, chiều cao cây đạt 8,9 cm, số lá/cây đạt 7,0, số rễ/cây đạt 5,8, chiều dài rễ đạt 5,5cm (Bảng 6, Hình 4). Điều này sẽ làm tăng tỷ lệ sống cũng như khả năng sinh trưởng và phát triển của cây ở ngoài vườn ươm.

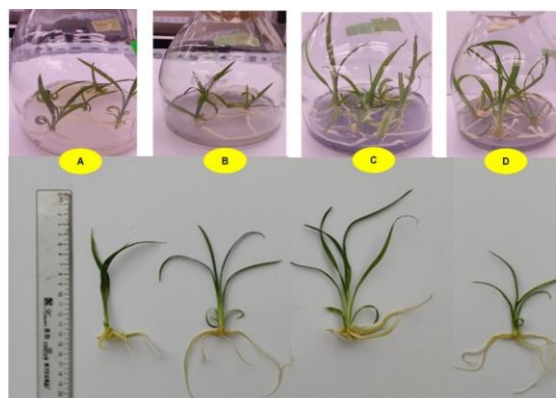
3.4. Kiểm tra số lượng nhiễm sắc thể của cây tái sinh

Kiểm tra số lượng nhiễm sắc thể của cây kim châm tam bội tái sinh đã xác định 100% cây tái sinh có bộ nhiễm sắc thể là $3x = 33$ (Hình 5B) cho thấy không có sự sai khác với cây mẹ (Hình 5A). Điều này cho thấy không có sự khác biệt về di truyền của cây tái sinh khi nhân nhanh *in vitro* trên môi trường có bổ sung chất điều tiết sinh trưởng.

Bảng 6. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng ra rễ của cây kim châm (sau 4 tuần)

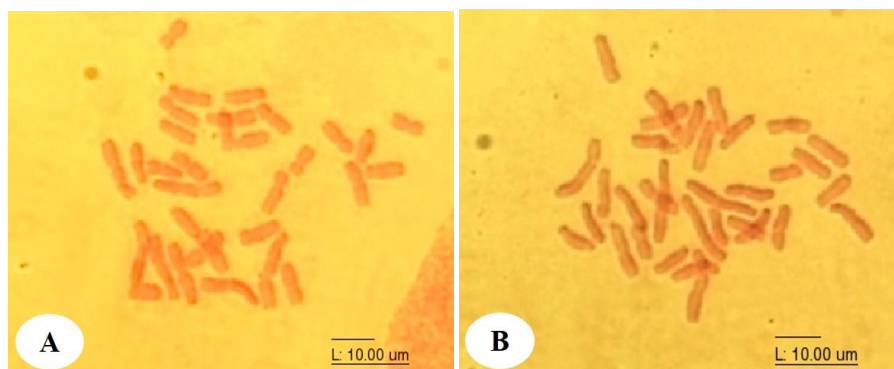
Than hoạt tính (g/l)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây (lá)	Số rễ/cây (rễ)	Chiều dài rễ (cm)
0,0	87,2	4,1 ^a	5,1 ^a	2,8 ^a	3,0 ^a
0,1	88,1	6,2 ^{ab}	5,6 ^{ab}	3,3 ^a	4,9 ^b
0,3	88,6	8,9^c	7,0^c	5,8^b	5,5^b
0,5	86,3	7,0 ^b	6,5 ^{bc}	3,8 ^{ab}	5,0 ^b
CV (%)		1,5	1,6	1,5	1,3
LSD _{0,05}		1,3	1,2	2,3	2,2

Chú thích: Trên cùng một cột các chữ cái khác nhau thì khác nhau với mức ý nghĩa $P < 0,05$.



Ghi chú: A: 0,0; B: 0,1; C: 0,3; D: 0,5 g/l.

Hình 4. Sự tạo rễ của chồi sau 4 tuần (chồi hình thành từ callus của cánh hoa) trên môi trường MS có bổ sung than hoạt tính



Ghi chú: A: Cây mẹ; B: Cây tái sinh.

Hình 5. Nhiễm sắc thể ($3n = 33$) của cây kim châm

Bảng 7. Sự sinh trưởng, phát triển và sự ra hoa của cây hoa kim châm tam bội tái sinh từ callus (sau trồng 11 tháng)

Chỉ tiêu theo dõi	Cây mẹ	Cây tái sinh	P <0,05
Số lá/cây (lá)	18,5 ± 0,9 ^a	17,8 ± 0,8 ^a	NS
Chiều cao cây (cm)	82,6 ± 9,2	78,1 ± 8,1	NS
Số thân mới/cây	2,6 ± 0,1	1,9 ± 0,1	*
Tỷ lệ cây ra hoa (%)	100,0	98,0	
Số ngồng hoa/thân	1,6 ± 0,5	1,0 ± 0,0	*
Số nụ/ngồng hoa	9,5 ± 0,2	7,4 ± 0,1	*
Đường kính hoa (cm)	16,8 ± 0,4	15,2 ± 0,8	NS
Số cánh hoa/bông	15,2 ± 1,6	15,1 ± 0,5	NS
Màu sắc hoa	Cam	Cam	NS
Chiều dài cánh hoa trong (cm)	8,5 ± 0,3	9,2 ± 0,9	NS
Chiều rộng cánh hoa trong (cm)	2,0 ± 0,1	2,3 ± 0,1	NS
Chiều dài cánh hoa ngoài (cm)	8,6 ± 0,2	8,5 ± 0,4	NS
Chiều rộng cánh hoa ngoài (cm)	1,8 ± 0,10	1,6 ± 0,2	NS

Ghi chú: NS: không có sự sai khác ở mức xác suất $P < 0,05$; ^a: Giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (SD), $n = 30$; *: $P < 0,05$: sự sai khác có ý nghĩa khi sử dụng hàm Student's t-test để so sánh giữa cây mẹ và cây tái sinh.



Hình 6. Cây hoa kim châm nở hoa (A: Cây mẹ; B: Cây tái sinh)

3.5. Đánh giá sinh trưởng, phát triển, năng suất và chất lượng hoa của cây tái sinh ngoài vườn sản xuất

Kết quả ở bảng 7 và hình 6 cho thấy cây tái sinh thông qua con đường tạo callus từ cánh hoa sinh trưởng, phát triển bình thường và không có sự sai khác so với cây mẹ. Sau 11 tháng trồng chiều cao cây đạt 78,1cm, số lá/cây đạt 17,8 lá, tỷ lệ ra hoa đạt 98%. Số lượng cánh hoa/bông, kích thước bông cũng như màu sắc của hoa đều không có sự sai khác so với cây mẹ. Tương tự như nghiên cứu của Meyer (1976), cây tái sinh từ nuôi cấy nụ của cây kim châm tứ bội ra hoa sau trồng 24 tháng, chất lượng hoa không thay đổi so với cây mẹ.

4. KẾT LUẬN

Sử dụng cánh hoa khi nụ có kích thước từ < 5cm để làm nguồn mẫu nuôi cấy và môi trường MS có bổ sung 2 mg/l 2,4-D và 10 mg/l BA là môi trường tốt nhất, tỷ lệ tạo callus đạt 83,3%. Tái sinh chồi từ callus của cánh hoa cho số lượng chồi cao nhất (đạt 12,9 chồi/mẫu) trên môi trường MS bổ sung 2 mg/l BA và 0,25 mg/l α -NAA. Môi trường MS bổ sung 0,3 g/l than hoạt tính là môi trường tốt nhất cho chồi ra rễ với tỷ lệ 88,6%, chiều cao cây đạt 8,9cm, số rễ/cây đạt 5,8 rễ, chiều dài rễ đạt 5,5cm. Cây tái sinh có bộ nhiễm sắc thể hoàn toàn tương đồng với cây mẹ ($3x = 33$). Cây sinh trưởng, phát triển tốt và ra hoa sau trồng 11 tháng. Sử dụng cánh hoa để nuôi cấy trong *in vitro* sẽ là một trong

những biện pháp hiệu quả trong việc nhân nhanh cây giống hoa kim châm, nhất là cây tam bội trong thời gian ngắn.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn Ủy ban nhân dân tỉnh Hưng Yên, Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Hưng Yên đã cấp kinh phí thực hiện nghiên cứu này (đề tài: Nghiên cứu lai tạo và phát triển hoa Kim châm (*Hemerocallis sp.*) tại Hưng Yên, mã số: 13/HĐSKHCN)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adelberg J., Delgado M. & Tomkin J. (2007). *In vitro* sugar and water use in diploid and tetraploid genotypes of Daylily (*Hemerocallis spp.*) in liquid medium as affected by density and plant growth regulators. HortScience. 42(2): 325-328.
- Du Y.M., Zhong Y., Shang H.Q. & Cheng F.Y. (2020). Callus induction and differentiation from the filament of *Paeonia ostii* “Fengdan”. Plant Res. 40: 514-522.
- Eman T., Abdulrahman R., Rahma M., Menna-Allah A., Mohamed H. & Mohamed F.A. (2022). Identification of *Hemerocallis in vitro* culture and estimation of its physiological activities. Ornamental and Medicinal Plants. 5(1): 1-11.
- Gulia S.K., Singh B.P., Carter J. & Griesbach R.J. (2009). Daylily: botany, propagation, breeding. In: Janick J (ed) Horticultural reviews. 35: 193-220.
- Kanyand M., Ning W., Stephan C., & George A. (2013). A more Improved protocol for *in vitro* shoot organogenesis in daylily (*Hemerocallis sp.*). African Journal of Biotechnology. 12(8): 820-825.

- Kanyand M.S., Meordrick S. & Li C. (2020). High frequency in vitro regeneration of adventitious shoots in daylilies (*Hemerocallis* sp.) stem tissue using thidiazuron. *BMC Plant Biology*. 20(31): 1-10.
- Kanyand M., Meordrick S., & Li C. (2021a). In vitro daylily (*Hemerocallis* species) bract multiple shoot induction. *African Journal of Biotechnology*. 20(2): 43-50.
- Kanyand M., McGowan Z. & Li C. (2021b). Shoot organogenesis and pluripotency profile in daylily flower bud. *Journal of Biotech Research*. 12: 42-51.
- Kumar S., Jinda S.K., Sarao N.K. & Dhaliwal M.S. (2020). Callus induction and plant regeneration of tomato through anther culture. *Vegetable Science*. 47(1): 23-27
- Matsuoka M. (1971). Spontaneous occurrence of triploid *Hemerocallis* in Japan. *Japan Journal Breed*. 21: 275-284.
- Meyer. M.M. (1976). Propagation of Daylilies by tissue culture. *HortScience*. 11(5): 485-487
- Mlcek J. & Rop O. (2011). Fresh edible flowers of ornamental plants - A new source of nutraceutical foods. *Trends Food Sci. Technol*. 22: 561-569.
- Murashige T. & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15: 473-479.
- Nguyễn Thị Lâm Hải, Phạm Thị Minh Phượng, & Trịnh Thị Kim Dung (2016). Nghiên cứu nhân giống trên cây hoa hiên (*Hemerocallis fulva*). *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 14(6): 913-920.
- Östergren G. & Heneen W.K. (1962). A squash technique for chromosome morphological studies. *Hereditas*. 48: 332-341.
- Petit T.L. & John P.P. (2008). *The new encyclopedia of daylilies - more than 1700 outstanding selections*. Timber Press Portland/London.
- Plodeck J. (2002). The origin of the daylily cultivar traits. *Hemerocallis Lett*. 8: 22-28.
- Phạm Thị Minh Phượng & Nguyễn Anh Đức (2018). Nghiên cứu một số biện pháp kỹ thuật nhân giống vô tính cây hoa hiên tại Hà Nội. *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển Nông thôn*. 2: 72-78.
- Saleh R.M., Mahmud T.N., Elias H. & Hamid H.A.A. (2019). Detection of Somaclonal Variation in Micropropagated and Acclimatized Plantlets of *Oryza sativa* MRQ 74 from Stem Explants. *Planta Daninha*. 37(3): 1-12.
- Seguí-Simarro J.M & Nuez F. (2007). Embrogenesis induction, callogenesis and plant regeneration by in vitro culture of tomato isolated microspores and whole anthers. *Journal of Experimental Botany*. 58: 19-32.
- Shi X.L., He S.L., & Jia W.Q. (2021). Preliminary study on rapid propagation technique of terminal bud of Peony "Dahuhong". *J. Henan Inst. Sci. Technol*. 49: 1-5.
- Trần Khắc Thi, Đoàn Thị Thùy Vân, Đặng Thu Hòa, Phạm Thị Thanh Thìn, Đặng thị Mai, Chu Thị Lan Hương, & Lê Thanh Nhuận (2010). Nghiên cứu tạo cây dưa chuột và ớt đơn bội bằng kỹ thuật nuôi cấy bao phấn in vitro. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. 3: 88-92.
- Wei M.M., Wang J.M., Muhammad I. & Hong B. (2014). *In vitro* culture and plant regeneration of chimeric petals of chrysanthemum flower color. *J. Beijing For. Univ*. 36: 107-112.
- Wu H., Ao Q., Li H., & Long F. (2023). Rapid and Efficient Regeneration of *Rhododendron decorum* from Flower Buds. *Horticulturae*. 9: 264-275.
- Xia C., Ye C., Yang H., Ji W., Xu Z., Ye S., Wang H., Jin S., Yu C. & Zhu X. (2022). Callogenesis and Plant Regeneration in Peony (*Paeonia × suffruticosa*) Using Flower Petal Explants. *Horticulturae*. 8: 357-367.
- Zhang C., Cao D.M., Zhang X.C., Kang L.F., Duan J.J., Ma X.L., Yan G.J. & Wang Y.S. (2014). Ploidy variation and karyotype analysis in *Hemerocallis* spp. (*Xanthorrhoeaceae*) and implications on daylily breeding. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 42(3): 183-193.