

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY HOA HIỀN (*Hemerocallis fulva*)

Nguyễn Thị Lâm Hải^{1*}, Phạm Thị Minh Phượng², Trịnh Thị Mai Dung²

¹*Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

²*Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

Email*: ntlhai@vnua.edu.vn

Ngày gửi bài: 21.01.2016

Ngày chấp nhận: 28.06.2016

TÓM TẮT

Cây hoa hiền (*Hemerocallis fulva*) được đánh giá là cây trồng có giá trị làm cảnh và làm thuốc. Trong nghiên cứu này chúng tôi bước đầu xác định các thông số cơ bản của quy trình nhân nhanh *in vitro* cho cây hoa hiền bao gồm môi trường nuôi cấy khởi động, chất điều tiết sinh trưởng phù hợp cho nhân nhanh và tạo rễ đối với chồi cây hoa hiền *in vitro*. Kết quả nghiên cứu cho thấy, MS + 1 mg/L BA + 1 mg/L α -NAA là môi trường thích hợp nhất để nuôi cấy khởi động chồi hoa hiền. Môi trường thích hợp để nhân nhanh chồi cây hoa hiền là môi trường MS + 1 mg/L BA + 1 mg/L IBA. Môi trường tối ưu để tạo rễ cho chồi cây hoa hiền *in vitro* là MS + 0,5 mg/L α -NAA. Ra ngôi cây hoa hiền trên đất phù sa ẩm đạt hiệu quả cao nhất.

Từ khóa: *Hemerocallis fulva*, hoa hiền, nhân nhanh *in vitro*.

In vitro Propagation of Daylily (*Hemerocallis fulva*)

ABSTRACT

Hemerocallis fulva is considered as a crop with high ornamental and medicinal value. In this study, we initially determined the basic parameters of the *in vitro* multiplication for *H. fulva*, including appropriate *in vitro* initiation medium, culture medium, and rooting and hardening media for *H. fulva*. The results showed that the optimal medium for *in vitro* initiation culture was MS + 1 mg/L BA + 1 mg/L α -NAA. The suitable medium for *in vitro* shoot multiplication was MS + 1 mg/L BA + 1 mg/L IAA; The rooting medium was MS supplemented with 0.5 mg/L α -NAA; Highest efficiency for hardening of *Hemerocallis fulva in vitro*-derived plantlets in green house was achieved with moist alluvial soil.

Keywords: Day lily, *Hemerocallis fulva*, *in vitro* propagation.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây hoa hiền (*Hemerocallis fulva*) có hoa màu vàng cam là giống hoa đặc hữu của Việt Nam, đây là giống cây thân thảo sống lâu năm, loài cây này không chỉ có giá trị làm cảnh mà còn là vị thuốc quý chữa bệnh đường tiết niệu, chảy máu cam, động thai... Hoa của cây này chứa nhiều chất có lợi cho sức khỏe như protein, chất béo, nito tự do, đường khử, tinh bột và là nguồn vitamin A, B1 và C dồi dào. Hiện nay trên thế giới có khoảng hơn 6.000 giống hoa hiền lai tạo được đăng ký và xuất hiện trên thị trường với đủ màu sắc rực rỡ đáp ứng nhu cầu

thị hiếu thay đổi không ngừng và việc thưởng ngoạn mỗi ngày một tinh tế hơn của xã hội.

Đối với Việt Nam, cây hoa hiền được trồng làm cảnh ở nhiều nơi, đặc biệt là những vùng có khí hậu quanh năm ẩm mát như Tam Đảo, Sa Pa và Đà Lạt nhưng chưa có nơi nào trồng hoa hiền với diện tích lớn bởi các hạn chế về năng suất và sản lượng. Hoa hiền thường được tạo giống bằng cách tách củ con từ củ mẹ hoặc thu các củ con hình thành từ các lóng thân ngầm dưới đất, nhân giống từ hạt... các phương pháp nhân giống này giúp cây nhanh ra hoa và giữ được các đặc điểm tốt của cây mẹ nhưng cây con thường không đồng đều do không được phân loại

tốt, thời gian nhân giống dài dẫn đến năng suất không cao, cây con dễ nhiễm bệnh.

Để khắc phục các nhược điểm do quá trình nhân giống truyền thống mang lại, việc nhân giống cây hoa hiên bằng phương pháp nuôi cấy mô đã được sử dụng rộng rãi và thành công trên thế giới. Nhiều tác giả đã thành công trong quá trình nhân nhanh *in vitro* cây hoa hiên khi sử dụng vật liệu khởi đầu là mầm hoa, cánh hoa, bầu nhụy hoặc chỉ nhị (Heuser and Apps, 1976; Chu and Kurtz, 1990; Dunwell, 2000; Lemanska, 2000, Zhao *et al.*, 2011). Ưu điểm của phương pháp nhân giống này là thời gian nhân giống ngắn, tạo được cây con sạch bệnh, đồng đều, hệ số nhân giống cao và đáp ứng được nhu cầu cả về số lượng và chất lượng giống. Bên cạnh đó, nhân giống vô tính *in vitro* các loài hoa hiên còn tạo vật liệu cho nghiên cứu chọn tạo giống mới bằng kỹ thuật gây đột biến, chuyển gen.

Hiện nay, trong công cuộc chuyển đổi cơ cấu cây trồng theo hướng sản xuất sản phẩm nông nghiệp hàng hóa có giá trị cao, việc phát triển cây hoa nói chung và hoa hiên nói riêng phục vụ tiêu dùng trong nước đang là hướng đi mang lại nhiều lợi ích kinh tế. Vì vậy, việc nghiên cứu nhân nhanh giống hoa hiên và bảo tồn được đặc điểm của giống là việc rất cần thiết. Tuy nhiên việc sử dụng cây hoa hiên làm đối tượng để nhân giống nuôi cấy mô hiện vẫn chưa được thực hiện ở Việt Nam. Xuất phát từ lý do đó chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục đích tìm được quy trình nhân nhanh *in vitro* cây hoa hiên để nhân giống cây hoa hiên cho hiệu quả cao và chủ động được nguồn cây giống đồng đều cho sản xuất.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chồi *in vitro* cây hoa hiên (*Hemerocallis fulva*) hoa màu vàng cam đặc hữu của Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khử trùng và tạo vật liệu khởi đầu

Củ có mang đỉnh sinh trưởng cây hoa hiên được rửa sạch dưới vòi nước chảy, đem khử trùng với dung dịch $HgCl_2$ 0,1% trong 12 phút.

Mẫu cấy sau khi khử trùng được cắt thành đoạn ngắn khoảng 1,0 cm và cấy vào môi trường phát sinh cây thích hợp. Môi trường nuôi cấy là môi trường MS (Murashige Skoog, 1962) cơ bản, có bổ sung các chất điều tiết sinh trưởng như BA, α -NAA (Bảng 1).

2.2.2. Nhân nhanh chồi

Chồi *in vitro* cây hoa hiên được cắt bỏ phần lá và giữ lại phần gốc dài 1,0 - 1,5 cm rồi cấy vào môi trường MS có bổ sung BA, Kinetin, IAA và IBA riêng rẽ hoặc kết hợp ở các nồng độ khác nhau (Bảng 2, 3) nhằm tìm ra công thức môi trường nhân nhanh tối ưu nhất và cho hệ số nhân cao nhất cho cây hoa hiên trong điều kiện *in vitro*.

2.2.3. Tạo rễ cho chồi *in vitro*

Chồi cây hoa hiên được dùng để bố trí thí nghiệm là chồi đơn, chiều cao từ 1,0 - 1,5 cm, đã cắt bỏ phần lá và cấy vào môi trường ra rễ có bổ sung than hoạt tính hoặc α -NAA (Bảng 4).

Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH = 5,7 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút, 1 atm. Điều kiện nuôi cấy *in vitro*: 16h chiếu sáng/8h tối, cường độ ánh sáng 2.000 - 2.500 lux, nhiệt độ 25 ± 2°C.

2.2.4. Thich nghi cây ngoài vườn ươm

Cây hoa hiên *in vitro* sau khi đạt số rễ trung bình là 5 rễ, chiều dài rễ trung bình là 3,6 cm, chiều cao cây từ 8 - 10 cm, số lá từ 3 - 5 cái thì tiến hành ra cây trên các giá thể khác nhau để tìm ra loại giá thể thích hợp nhất khi ra ngoài cây *in vitro*.

Bố trí thí nghiệm: Mỗi thí nghiệm được tiến hành với 10 mẫu cấy, 3 lần lặp lại.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo vật liệu khởi đầu

Giai đoạn nuôi cấy khởi động là giai đoạn đưa đối tượng nuôi cấy ngoài tự nhiên vào điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Ở giai đoạn này, bên cạnh phương thức khử trùng hiệu quả, môi trường nuôi cấy khởi động ban đầu nhằm tạo nguồn vật liệu có tỷ lệ sống cao, mô tồn tại phân hoá và

sinh trưởng tốt có ý nghĩa quyết định đối với sự thành công ban đầu và cả quá trình nhân giống vô tính *in vitro* tiếp theo. Trong nghiên cứu này, chế độ khử trùng với dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 12 phút cho kết quả tỉ lệ mẫu sạch đạt trên 90% (số liệu không được trình bày), tuy nhiên với mục tiêu kích thích mẫu cấy tạo chồi mới ngay trong giai đoạn nuôi cấy khởi động, chúng tôi tiến hành nuôi cấy các chồi sau khi khử trùng trên các môi trường có bổ sung chất điều tiết sinh trưởng BA hoặc α -NAA đơn lẻ hoặc riêng rẽ.

Việc bổ sung chất điều tiết sinh trưởng BA và α -NAA đơn lẻ hoặc kết hợp đều có tác dụng

kích thích mẫu cấy phát sinh chồi nhiều hơn so với môi trường không bổ sung các hormon này (Bảng 1). Hệ số nhân chồi ở các công thức có bổ sung chất điều tiết sinh trưởng đều cao hơn so với công thức không bổ sung và cao nhất đạt trung bình 2,67 chồi/mẫu cấy ở CT6 với nồng độ BA và α -NAA bổ sung ở mức 1 mg/l (Hình 1). Công thức môi trường này là thích hợp nhất để tạo nguồn cụm chồi từ nguồn chồi đơn cấy khởi động mẫu ban đầu, khắc phục được hiện tượng 1 mẫu chỉ phát sinh 1 chồi *in vitro* trong quá trình nuôi cấy khởi động, tạo được nguồn mẫu nhanh chóng và thuận lợi cho các thí nghiệm nhân nhanh tiếp theo.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA và α -NAA đến sự phát sinh chồi cây hoa hiên
(sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức	Nồng độ BA (mg/l)	Nồng độ α -NAA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu bật chồi (%)	Hệ số nhân (chồi/mẫu)	Chiều cao TB chồi (cm)	Chất lượng chồi
ĐC	0,0	0,0	0,00	1,00	5,03	+
CT1	0,5	0,0	16,67	1,25	5,82	++
CT2	1,0	0,0	25,00	2,08	6,16	+++
CT3	1,5	0,0	16,67	1,25	5,75	++
CT4	2,0	0,0	8,30	1,25	6,18	++
CT5	1,0	0,5	41,67	2,08	6,43	+++
CT6	1,0	1,0	58,33	2,67	5,66	+++
CT7	1,0	1,5	33,33	1,67	6,05	+
CT8	1,0	2,0	41,67	1,58	5,75	+
CV (%)				4,6	1,7	
LSD _{0,05}				0,13	0,15	

Ghi chú: +: chồi phát triển bình thường, hệ số nhân thấp; ++: chồi phát triển bình thường, hệ số nhân không cao
+++: chồi phát triển tốt, hệ số nhân cao



Hình 1. Chồi cây hoa hiên trên môi trường khởi động (MS + 1 mg/l BA + 1 mg/l α -NAA)
(sau 4 tuần nuôi cấy)



Hình 2. Chồi cây hoa hiên trên môi trường có bổ sung 2 mg/l Kinetin
(sau 4 tuần nuôi cấy)

3.2. Nhân nhanh chồi

Chồi cây hoa hiên sau khi phát sinh trên môi trường thích hợp đã cho tỷ lệ chồi nhất định. Tuy nhiên, chúng tôi đã tiến hành các thí nghiệm khảo sát môi trường nhân nhanh để tìm ra môi trường tốt nhất nhân chồi *in vitro* cây hoa hiên. Trong nội dung này, BA, Kinetin, IAA được bổ sung đơn lẻ hoặc kết hợp với nhau vào môi trường nuôi cấy để khảo sát môi trường nhân nhanh chồi phù hợp nhất.

3.2.1. Ảnh hưởng của Kinetin và IAA đến sự nhân nhanh chồi cây hoa hiên

Trong các chất điều tiết sinh trưởng, Kinetin được sử dụng phổ biến trong việc nhân nhanh chồi *in vitro*. Kinetin kích thích sự phân chia tế bào, trong kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật, Kinetin thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để kích thích sự hình thành callus hoặc phôi vô tính, đồng thời kích thích quá trình tái sinh từ callus trở thành chồi. Trong thí nghiệm này, Kinetin được bổ sung vào môi trường với các dải nồng độ từ 0 - 2 mg/l, thí nghiệm được theo dõi trong 4 tuần, kết quả được trình bày ở bảng 2 và hình 2.

Kết quả trình bày ở bảng 2 và hình 2 cho thấy việc bổ sung Kinetin vào môi trường nuôi cấy đã làm tăng hệ số nhân chồi của mẫu cấy

khi so sánh với môi trường không bổ sung Kinetin. Hệ số nhân chồi ở công thức có bổ sung Kinetin tăng rõ rệt và cao nhất ở công thức có bổ sung 2 mg/l với hệ số nhân chồi là 3,08 chồi/mẫu. Nồng độ tối ưu này được sử dụng làm nồng độ chuẩn trong nghiên cứu ảnh hưởng kết hợp giữa Kinetin và IAA đến sự nhân nhanh chồi với dải nồng độ của IAA thay đổi từ 0 đến 1 mg/l. Tuy nhiên, kết quả cho thấy việc bổ sung tổ hợp Kinetin và IAA không làm tăng hệ số nhân chồi của mẫu cấy so với công thức đối chứng chỉ bổ sung Kinetin đơn lẻ (CT4). Công thức đối chứng bổ sung 2 mg/l Kinetin cho hệ số nhân chồi là 3,08 chồi/mẫu trong khi các công thức bổ sung Kinetin kết hợp IAA lại cho hệ số nhân cao nhất chỉ đạt 2,5 chồi/mẫu. Như vậy, việc bổ sung kết hợp giữa Kinetin và IAA vào môi trường nuôi cấy không có tác dụng tích cực đến sự nhân nhanh *in vitro* cây hoa hiên so với việc bổ sung Kinetin đơn lẻ.

3.2.2. Ảnh hưởng của BA và IAA đến sự nhân nhanh chồi *in vitro* cây hoa hiên

Trong thí nghiệm này, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của BA và IAA đến sự nhân nhanh chồi cây hoa hiên *in vitro*. Nồng độ BA được khảo sát dao động từ 0 đến 2,0 mg/l, còn nồng độ IAA dao động từ 0 đến 1 mg/l bổ sung kết hợp với nồng độ tối ưu của BA.

Bảng 2. Ảnh hưởng của Kinetin và IAA đến sự nhân nhanh chồi *in vitro* cây hoa hiên (sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức	Nồng độ Kinetin (mg/l)	Nồng độ IAA (mg/l)	Hệ số nhân (chồi/mẫu)	Chiều cao TB chồi (cm)	Chất lượng chồi
ĐC	0	0	1,92	7,03	+
CT1	0,5	0	2,25	5,78	++
CT2	1,0	0	2,41	7,16	++
CT3	1,5	0	2,75	6,32	++
CT4	2,0	0	3,08	5,98	+++
CT5	2,0	0,25	2,50	9,28	++
CT6	2,0	0,50	2,42	7,53	++
CT7	2,0	0,75	2,00	7,42	+
CT8	2,0	1,00	1,5	8,14	+
CV (%)			4,9	1,5	
LSD _{0,05}			0,18	0,14	

Ghi chú: +: chồi phát triển bình thường, hệ số nhân thấp; ++: chồi phát triển bình thường, hệ số nhân không cao
+++: chồi phát triển tốt, hệ số nhân cao

Bảng 3. Ảnh hưởng của BA và IAA đến sự nhân nhanh chồi hoa hiên
(sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức	Nồng độ BA (mg/l)	Nồng độ IAA (mg/l)	Hệ số nhân (lần)	Chiều cao TB chồi (cm)	Chất lượng chồi
CT1	0	0,00	1,25	7,37	+
CT2	0,5	0,00	1,67	6,75	++
CT3	1,0	0,00	2,50	7,67	+++
CT4	1,5	0,00	1,75	8,78	++
CT5	2,0	0,00	1,50	8,23	+
CT6	1,0	0,25	1,83	10,17	++
CT7	1,0	0,50	2,33	8,83	++
CT8	1,0	0,75	2,67	9,99	+++
CT9	1,0	1,00	3,75	9,04	+++
CV (%)			4,3	3,6	
LSD _{0,05}			0,15	0,47	

Ghi chú: +: chồi phát triển bình thường, hệ số nhân thấp; ++: chồi phát triển bình thường, hệ số nhân không cao; +++: chồi phát triển tốt, hệ số nhân cao

Kết quả được trình bày ở bảng 3 cho thấy BA có tác dụng tốt trong việc nhân nhanh cây hoa hiên trong nuôi cấy *in vitro*. Trong các công thức có bổ sung BA, hệ số nhân chồi tăng dần từ công thức có bổ sung 0,5 mg/l BA (1,65 chồi/mẫu) và đạt cao nhất ở công thức có bổ sung 1,0 mg/l BA (2,5 chồi/ mẫu). Sau đó giảm xuống ở công thức bổ sung thêm lượng BA. Vậy trong thí nghiệm trên, nồng độ BA khi bổ sung riêng rẽ cho kết quả tốt nhất là 1,0 mg/l với hệ số nhân đạt 2,5 chồi/ mẫu.

Bên cạnh đó, việc bổ sung tổ hợp BA và IAA cũng có tác dụng rất tốt trong việc làm tăng hệ số nhân chồi của mẫu cấy. Ở công thức không bổ sung IAA mà chỉ bổ sung BA đơn lẻ vào môi trường nuôi cấy thì hệ số nhân chỉ đạt cao nhất là 1,75 trong khi các công thức bổ sung tổ hợp BA và IAA cho kết quả cao hơn và cao nhất đạt hệ số nhân 3,75 chồi/mẫu cấy trong môi trường có bổ sung 1 mg/l BA và 1 mg/l IAA (Hình 3).

Như vậy, việc bổ sung IAA vào môi trường nuôi cấy chứa 1 mg/l BA đã làm tăng hệ số nhân chồi của cây hoa hiên. Mẫu cấy trong môi trường MS + 1 mg/l BA + 1 mg/l IAA cho chồi xanh, phát triển tốt và cho hệ số nhân đạt 3,75 chồi/mẫu sau 4 tuần nuôi cấy.

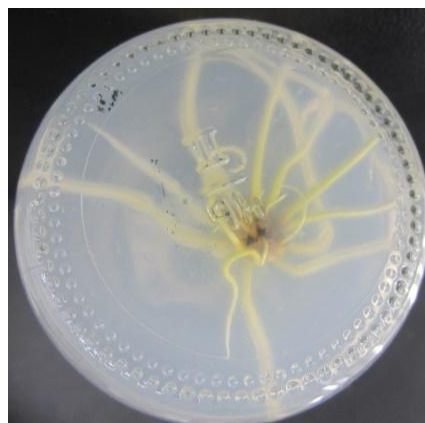
Như vậy, môi trường thích hợp nhất cho nhân nhanh chồi từ chồi cây hoa hiên là môi trường MS + 1mg/l BA + 1 mg/l IAA, cho hệ số nhân 3,75 chồi/mẫu sau 4 tuần nuôi cấy, chất lượng chồi đạt tiêu chuẩn cho việc tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh. Cũng nghiên cứu trên họ Hoa Hiên nhưng với đối tượng cây hoa hiên Ore Oriole, công bố của Zhao *et al.* (2011) lại cho thấy việc bổ sung BA ở nồng độ cao (6 mg/l) vào môi trường nuôi cấy có tác dụng tốt nhất đến sự nhân nhanh của chồi cây hoa hiên giống "Ore oriole". Điều này cho thấy, kiểu gen của cây hoa hiên ảnh hưởng lớn đến sự phản ứng của chồi trên môi trường nhân nhanh có sử dụng các hormon sinh trưởng thực vật khác nhau. Do vậy, việc nghiên cứu để tìm ra môi trường nhân nhanh thích hợp nhất với từng kiểu gen trong chi hoa hiên là rất cần thiết và có ý nghĩa khoa học.

3.3. Tạo cây hoàn chỉnh

Các chồi *in vitro* hình thành trong quá trình nuôi cấy có thể phát sinh rễ tự nhiên nhưng thông thường chúng cần được đưa sang môi trường kích thích tạo rễ. Tức là tái tạo cây hoàn chỉnh để chúng có thể sống sót và phát triển tốt khi đưa cây ra ngôi.



Hình 3. Chồi cây hoa hiên trên môi trường có bổ sung 1mg/l BA và 1mg/l IAA (sau 4 tuần nuôi cấy)



Hình 4. Rễ cây hoa hiên trên môi trường bổ sung 0,5 mg/l α - NAA (sau 4 tuần nuôi cấy)

Bảng 4. Ảnh hưởng của α-NAA đến sự ra rễ của cây hoa hiên (sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức	Nồng độ α-NAA (mg/l)	Số rễ trung bình (rễ)	Chiều dài rễ trung bình (cm)	Chất lượng rễ
ĐC	0	6,67	4,20	+
CT1	0,25	9,83	4,00	++
CT2	0,50	12,17	3,53	+++
CT3	0,75	10,42	2,61	+++
CT4	1,00	12,17	2,32	+++
CV (%)		1,5	2,9	
LSD _{0,05}		0,22	0,14	

Ghi chú: + : rễ nhỏ, phát triển bình thường; ++ :rễ nhỏ, phát triển tốt; +++: rễ to, phát triển tốt

Nhằm tìm ra môi trường ra rễ thích hợp cho cây hoa hiên, chúng tôi tiến hành thí nghiệm về sự ảnh hưởng của α- NAA và than hoạt tính tới sự hình thành rễ từ chồi hoa hiên.

Sau 4 tuần theo dõi, chúng tôi nhận thấy khi bổ sung α-NAA vào môi trường nuôi cấy đã có hiệu quả tích cực đến chiều cao cây, chiều dài rễ và số rễ trung bình trên chồi hoa hiên. Các công thức có bổ sung α- NAA đều tạo rễ. Số rễ thấp nhất ở công thức đối chứng khi không bổ sung α - NAA, cao nhất là ở nồng độ 0,5 mg/l α-NAA với số rễ là 12,47 rễ/mẫu (Hình 4).

Ngoài việc sử dụng α- NAA, than hoạt tính cũng có tác dụng tích cực trong việc kích thích

sự hình thành rễ ở nuôi cấy *in vitro*. Kết quả nghiên cứu (không được trình bày trong “báo cáo”) về việc sử dụng than hoạt tính trong việc tạo rễ cho chồi cây hoa hiên *in vitro* cho thấy việc sử dụng than hoạt tính có tác dụng tương đối tốt trên cây hoa hiên *in vitro*, tuy nhiên, số rễ và chiều dài rễ có sự chênh lệch tùy thuộc vào nồng độ than hoạt tính bổ sung vào môi trường. Ở công thức đối chứng không bổ sung than hoạt tính có số rễ hình thành ít hơn nhưng dài hơn, nhỏ hơn so với các công thức có bổ sung than hoạt tính. Số rễ ở công thức có bổ sung 0,25 g/l là 6,58 rễ/mẫu và giảm dần khi tăng lượng than hoạt tính lên đến 1,0 g/l.

Kết quả của chúng tôi phù hợp với kết quả của Amling *et al.* (2007) khi nhóm tác giả này tìm ra nồng độ α -NAA thích hợp cho môi trường ra rễ của loài hoa hiên *H. fulva* là 0,5 mg/l α -NAA. Trong khi đó, Lemanska *et al.* (2000) kết luận môi trường có chứa IBA (0,5 đến 2,5 mg/l) là thích hợp nhất cho cây hoa hiên giống Stella d'Oro, Strode and Oglesby (1976) nghiên cứu trên giống hoa hiên Azetec Gold cho kết quả môi trường ra rễ là MS bổ sung IAA (10 mg/L) và NAA (2 mg/L), Zhao *et al.* (2011) nghiên cứu trên giống hoa hiên Ore Oriole cho biết kết quả môi trường cho ra rễ là 1/2MS + 0,5 mg/L IBA. Như vậy, kết quả của chúng tôi không tương đồng với 3 nhóm tác giả kể trên. Tuy nhiên với kết quả thu được, chúng tôi kết luận môi trường ra rễ thích hợp cho loài hoa hiên *H. fulva* là MS + 0,5 mg/l α -NAA + 30 g/L sucrose và 8 g/L agar, pH =5,7.

Tóm lại, thí nghiệm tạo cây hoa hiên *in vitro* hoàn chỉnh bằng việc kích thích tạo rễ trên môi trường có bổ sung α -NAA hoặc than hoạt tính, chúng tôi nhận thấy sự khác biệt khá lớn trong kết quả tạo rễ. Cùng theo dõi trong 4 tuần nuôi cấy nhưng thí nghiệm có bổ sung α -NAA cho kết quả ra rễ tốt hơn rất nhiều so với bổ sung than hoạt tính. Như vậy, công thức tốt nhất để kích tạo rễ cho chồi cây *in vitro* là môi trường MS có bổ sung α -NAA với số rễ trung bình thu được sau 4 tuần nuôi cấy là 12,47 rễ/mẫu.

3.4. Thích nghi cây tại vườn ươm

Sau khi đã hoàn thiện quy trình tạo cây hoa hiên *in vitro* hoàn chỉnh, chúng tôi tiến hành các thí nghiệm đưa cây ra ngoài vườn ươm để

hoàn tất quy trình nhân giống cây hoa hiên. Cây hoa hiên *in vitro* sau khi đạt số rễ là 5 rễ, chiều dài rễ trung bình là 3,6 cm, chiều cao cây từ 8 - 10 cm, có khoảng 5 lá thì tiến hành ra cây trên các giá thể khác nhau.

Kết quả thu được cho thấy, cây hoa hiên khi ra ngôi đều sinh trưởng và phát triển tốt ở 4 giá thể với chiều cao cây và số lá xấp xỉ bằng nhau với chiều cao cây xấp xỉ 11,6 cm và số lá là xấp xỉ 3,5 lá/cây (Bảng 5, Hình 5). Như vậy đối với việc ra ngôi cây hoa hiên, giá thể nào cũng phù hợp với cây, tuy nhiên, để tiết kiệm chi phí, chúng tôi đề xuất sử dụng giá thể đất phù sa để tiến hành ra ngôi cây *in vitro* và thích nghi cây ngoài vườn ươm.

4. KẾT LUẬN

Môi trường nuôi cấy khởi động thích hợp nhất cho chồi cây hoa hiên là MS + 1 mg/l BA + 1 mg/l α -NAA với tỷ lệ 2,67 chồi/mẫu, chiều cao chồi trung bình 5,66 cm sau 4 tuần nuôi cấy.

Môi trường nhân nhanh *in vitro* chồi cây hoa hiên cho hệ số nhân cao, chồi sinh trưởng phát triển tốt là MS + 1 mg/l BA + 1 mg/l IAA, đạt 3,75 chồi/mẫu và chiều cao trung bình 9,04 cm sau 4 tuần nuôi cấy.

Môi trường ra rễ cho chồi cây hoa hiên *in vitro* là MS + 0,5 mg/l α -NAA với tỷ lệ ra rễ đạt 100%, số rễ trung bình là 12,17 rễ/ chồi và chiều dài trung bình của rễ là 3,53 cm sau 4 tuần nuôi cấy.

Giá thể ra cây thích hợp nhất là đất phù sa với tỷ lệ sống đạt 100% và chiều cao trung bình của cây ra ngôi sau 4 tuần theo dõi là 11,69 cm.

Bảng 5. Ảnh hưởng của giá thể trồng đến khả năng sinh trưởng của cây hoa hiên trên vườn ươm sau 4 tuần theo dõi

Công thức	Giá thể	Tỷ lệ sống (%)	Số lá trung bình (lá)	Chiều cao cây (cm)	Chất lượng cây
CT1	Cát	99,3	3,50	11,65	++
CT2	Đất	100,0	3,58	11,69	+++
CT3	Đất : trấu hun (3:1)	100,0	3,83	11,65	+++
CT4	Đất:cát (3:1)	93,3	3,58	11,48	+++
CV (%)			3,4	1,0	
LSD0,05			0,22	0,20	

Ghi chú: ++ : cây sinh trưởng phát triển bình thường, lá xanh tốt, +++ : cây sinh trưởng phát triển tốt, lá xanh tốt



Hình 5. Cây hoa hiên sau 4 tuần ra ngôi trên giá thể đất phù sa

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Amling J.W., Keever G.J., Kessler J.R. and Eakes D.J. (2007). Benzyladenine (BA) promotes ramet formation in *Hemerocallis*. *J. Environ. Hort.*, 25(1): 9-12.
- Chu, I. Y. E. and Kurtz, S. L. (1990). Commercialization of plant micropropagation, *In: Ammirato, P. V., Evans, D. R, Sharp, W. and Bajaj, Y. P. S. (Eds.), Handbook of plant cell culture: ornamental Species*, McGraw-Hill Pub. Compo NY, pp. 126-164.
- Dunwell, W.C. (2000). *Hemerocallis* (daylily) propagation. Research and Education Center, Dept. Horticulture, Univ. Kentucky. Princeton, KY.
- Heuser, C.W. and D.A. Apps. (1976). *In vitro* plantlet formation from flower petal explant of *Hemerocallis* cv. Chipper Cherry. *Can. J. Bot.*, 54: 616-618.
- Lemanska, W.C. (2000). *Hemerocallis* (daylily) propagation. Research and Education Center, Dept. Horticulture, Univ. Kentucky. Princeton, KY.
- Murashige, T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Strode M. and Oglesby A. (1976). Daylily culture. Cooperative Extension Service, Circular 545/reprint. College of Agricultural and Environmental Science, Univ. Georgia, Athens.
- Zhao, S.K., Carter. J. and Garber D. (2011). Callus induction and *in vitro* plant regeneration in daylily. *HortScience*, 42: 972.