

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* VÀ SỰ SINH TRƯỞNG PHÁT TRIỂN *EX VITRO* CÂY HOA CÚC CHI (*CHRYSANTHEMUM INDICUM* L.) TẠI ĐÀ LẠT - LÂM ĐỒNG

Phan Xuân Huyền[✉], Trương Ngọc Thảo Vy, Nguyễn Thị Phượng Hoàng, Nguyễn Thị Thanh Hằng, Đinh Văn Khiêm

Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

[✉]Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: phanxuanhuyen1974@gmail.com

Ngày nhận bài: 23.9.2019

Ngày nhận đăng: 23.01.2020

TÓM TẮT

Cây hoa cúc chi (*Chrysanthemum indicum* L.) là một loại thảo dược quý và tốt cho sức khỏe của con người. Kết quả cho thấy môi trường MS bổ sung 25 g/L sucrose, 9 g/L agar, pH 5,8 là thích hợp nhất cho sự tái sinh và sinh trưởng chồi (chiều cao chồi đạt 2,41 - 2,47 cm, 1 chồi/mẫu). Môi trường MS bổ sung các nồng độ BA (0,1, 0,5, 1, 1,5, 2 mg/L), Kinetin (0,1, 0,5, 1, 1,5, 2 mg/L) và TDZ (0,1, 0,5, 1 mg/L) không phù hợp cho sự tái sinh và sinh trưởng chồi. Sự tái sinh và sinh trưởng chồi trên môi trường có bổ sung 1 g/L than hoạt tính tốt hơn (chiều cao cây 3,45 cm) môi trường không bổ sung than hoạt tính (chiều cao cây 2,46 cm). Môi trường MS bổ sung 0, 0,1, 0,5, 1 mg/L IBA, 25 g/L sucrose, 9 g/L agar, pH 5,8 đều phù hợp cho sự tạo rễ *in vitro*, tỷ lệ tạo rễ đạt 100%. Vụn xơ dừa là giá thể thích hợp nhất chuyển cây hoa cúc chi cấy mô ra ngoài vườn ươm, tỷ lệ sống đạt 100% và cây sinh trưởng tốt. Tưới phân Nitrophoska là thích hợp nhất cho sự sinh trưởng phát triển cây hoa cúc chi trồng trên giá thể vụn xơ dừa trong điều kiện nhà kính (chiều cao cây 61,70 cm, 100,80 hoa/cây, đường kính hoa 1,68 cm, khối lượng tươi 0,376 g/hoa). Kết quả cũng cho thấy, cây hoa cúc chi sinh trưởng phát triển tốt ở khí hậu Đà Lạt - Lâm Đồng, ra hoa quanh năm và có thể sử dụng cây giống có nguồn gốc từ nuôi cấy mô để trồng trong nhà kính.

Từ khóa: Cây hoa cúc chi, sự phát triển, sự sinh trưởng, sự tái sinh chồi, sự tạo rễ.

MỞ ĐẦU

Hoa cúc chi còn có tên gọi khác là kim cúc hay cúc hoa vàng, được trồng để dâng lên vua làm dược liệu nên còn có tên gọi khác là cúc “tiền vua”. Hoa cúc chi là một loại thảo dược quý và có giá trị kinh tế. Y học cổ truyền và y học hiện đại đã chứng minh hoa cúc chi có công dụng tốt cho sức khỏe, làm đẹp da và tóc, phòng ngừa và chữa trị nhiều loại bệnh như: chống oxy hóa, chống viêm và kháng khuẩn, chống trầm cảm và an thần, bệnh tiểu đường, bảo vệ gan và phòng chống bệnh ung thư (Võ Văn Chi, 1997; Chang *et al.*, 2010; Jeong *et al.*, 2013; Bhavani *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2018; Hussaini *et al.*, 2018; Humbarwadi, Patel, 2018). Chính vì những giá

trị trên nên việc nghiên cứu bảo tồn và phát triển cây hoa cúc chi là vấn đề rất cần thiết.

Trên thế giới đã có nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài *Chrysanthemum indicum* L. nhưng vẫn còn rất ít, hầu hết các nghiên cứu tập trung vào nghiên cứu thành phần hóa học trong bông hoa và tác dụng dược tính của nó (Gao *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2010; Eeckhaut, Van Huylenbroeck, 2011; Jeong *et al.*, 2013; Zafarullah *et al.*, 2013; Rajalashmi *et al.*, 2013; Rivai, Helmanto, 2015; Bhavani *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2018; Hussaini *et al.*, 2018; Humbarwadi, Patel, 2018). Nhưng ở nước ta chưa thấy công bố nghiên cứu nhân giống *in vitro*, thành phần hóa học và tác dụng dược tính của

bông hoa cúc chi. Hiện nay, cây hoa cúc chi được trồng nhiều tại tỉnh Hưng Yên theo phương pháp truyền thống với những hạn chế như: cây trồng từ hạt bị phân ly tính trạng, hạt giống có tỉ lệ nảy mầm thấp, cây bị thoái hóa, sinh trưởng phát triển kém và cho năng suất thấp; cây trồng ngoài đồng ruộng dễ bị hư hại do mưa gió, thiên tai, dịch bệnh làm ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng hoa. Việc nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học thực vật trong nhân giống *in vitro* và nuôi trồng cây hoa cúc chi trong điều kiện nhà kính sẽ khắc phục những hạn chế của phương pháp trồng truyền thống như: nhân giống *in vitro* cung cấp cây giống sạch bệnh và đồng nhất, cây sinh trưởng phát triển tốt và cho năng suất cao; trồng cây trong điều kiện nhà kính kiểm soát được mưa bão, thiên tai, nâng cao hiệu quả kinh tế trong trồng trọt, tạo ra sản phẩm sạch và có chất lượng tốt. Kết quả của nghiên cứu này góp phần xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* và nuôi trồng cây hoa cúc chi trên giá thể vụn xơ dừa trong nhà kính tại Đà Lạt - Lâm Đồng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mẫu cây hoa cúc chi trồng tại tỉnh Hưng Yên được thu về và rửa sạch bằng nước xà phòng, sau đó khử trùng bằng cồn 70° trong 1 min, cuối cùng khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 10 min. Mẫu sau khi khử trùng được cắt thành các đốt và cấy trên môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) có bổ sung 25 g/L sucrose, 10 g/L agar, pH 5,8. Những chồi non tái sinh từ các đốt thân được dùng làm nguồn vật liệu cho các thí nghiệm.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy

MS là môi trường được sử dụng cho những nghiên cứu *in vitro*, tùy theo mục đích của các thí nghiệm mà bổ sung các chất như: BA (6-benzyl adenin), Kinetin, TDZ (thidiazuron), IBA (Indole-3-butyric acid), than hoạt tính, sucrose và agar. Đối với những thí nghiệm *in vitro*, thời gian chiếu sáng 8 h/ngày, cường độ ánh sáng 34 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và độ ẩm không khí 75 - 85%. Những thí nghiệm *ex vitro* được thực hiện trong nhà kính có mái nylon trắng che mưa.

Phương pháp

Khảo sát ảnh hưởng của BA, Kinetin, TDZ đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro*

Những đốt thân cây hoa cúc chi *in vitro* (Hình 1a) được cấy trên môi trường MS bổ sung 0, 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2 mg/L BA; bổ sung 0, 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2 mg/L Kinetin; bổ sung 0, 0,1, 0,5, 1 mg/L TDZ, và tất cả các nghiệm thức đều bổ sung 25 g/L sucrose, 9 g/L agar, pH 5,8. Mỗi nghiệm thức cấy 15 mẫu, sau 30 ngày nuôi cấy tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao chồi (cm) và số chồi/mẫu.

Khảo sát ảnh hưởng của than hoạt tính đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro*

Những đốt thân cây hoa cúc chi *in vitro* (Hình 1a) được cấy trên môi trường MS không bổ sung và bổ sung 1 g/L than hoạt tính, 25 g/L sucrose, 9 g/L agar, pH 5,8. Mỗi nghiệm thức cấy 15 mẫu, sau 30 ngày nuôi cấy tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao chồi (cm), số chồi/mẫu, chiều dài rễ (cm) và tỷ lệ tạo rễ (%).

Khảo sát ảnh hưởng của IBA đến sự tạo rễ *in vitro*

Những chồi ngọn cây hoa cúc chi *in vitro* (Hình 1a) được cấy trên môi trường MS có bổ sung 0, 0,1, 0,5, 1 mg/L IBA, 25 g/L sucrose, 9 g/L agar, pH 5,8. Mỗi nghiệm thức cấy 15 mẫu, sau 10 ngày nuôi cấy tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều dài rễ (cm), số rễ/chồi, tỷ lệ chồi tạo rễ (%).

Khảo sát ảnh hưởng của giá thể đến tỉ lệ sống của cây nuôi cấy mô chuyển ra ngoài vườn ương

Những cây cúc chi cấy mô có đầy đủ thân lá rễ và có chiều cao khoảng 3 cm (Hình 2a) được trồng trên đất bazan, đất mùn và vụn xơ dừa. Mỗi nghiệm thức trồng 15 cây, sau 30 ngày nuôi trồng và chăm sóc tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao cây (cm), chiều dài rễ (cm) và tỷ lệ sống (%).

Khảo sát ảnh hưởng của phân bón đến sự sinh trưởng phát triển cây hoa cúc chi trồng trong nhà kính

Những ngọn cúc chi có nguồn gốc từ nuôi cấy mô (Hình 2b) được xử lý tạo rễ *ex vitro* (Hình

2c) làm vật liệu cho thí nghiệm. Giá thể trồng cây là vụn xơ dừa. Thí nghiệm được bố trí sử dụng 3 loại phân: phân Nutri-Gold (2 g/L), phân Nitrophoska (2 g/L) và phân sinh học Vinh Thanh (2 g/L). Các loại phân trên được hòa tan trong nước và tưới 200 mL vào chậu giá thể theo định kỳ 1 tuần 1 lần. Mỗi nghiệm thức trồng 10 cây trong chậu nhựa có chiều cao 20 cm và đường kính 28 cm, sau 90 ngày nuôi trồng và chăm sóc tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao cây (cm), tổng số hoa/cây, đường kính hoa (cm) và khối lượng tươi/hoa (g).

Xử lý số liệu

Số liệu của các thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm thống kê SPSS (bản 15.0) trong Duncan's test và T-test (Duncan, 1955) với $P \leq 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của BA, Kinetin, TDZ đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro*

Khả năng tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* từ đốt thân sau 30 ngày nuôi cấy được thể hiện trên Bảng 1. Kết quả cho thấy, tất cả những đốt thân nuôi cấy trên các môi trường đều tái sinh 1 chồi/mẫu, tuy nhiên ở những nghiệm thức được bố trí những chất kích thích sinh trưởng khác nhau và ở những nồng độ khác nhau thì sự sinh trưởng chồi khác nhau. Ở những nghiệm thức không bổ sung chất kích thích sinh trưởng BA, Kinetin và TDZ thì chồi sinh trưởng tốt nhất, chiều cao cây tương ứng 2,44 cm, 2,41 cm và 2,47 cm (Hình 1b₁, 1c₁, 1d₁). Kết quả cũng cho thấy, khi tăng nồng độ BA, Kinetin và TDZ thì chiều cao chồi giảm xuống và sự sinh trưởng của chồi cũng kém đi. Điều này có thể giải thích khi tăng nồng độ các chất kích thích sinh trưởng thì ức chế sự tăng trưởng chiều cao và sự sinh trưởng của chồi. Đặc điểm hình thái chồi cho thấy, chồi ở môi trường không bổ sung chất kích thích sinh trưởng có màu xanh đậm, chồi sinh trưởng tốt và tất cả các chồi đều tạo rễ, những nghiệm thức bổ sung chất kích thích sinh trưởng thì sự sinh trưởng chồi kém đi và chồi có biểu hiện thủy tinh thể (Hình 1b₂, 1b₃, 1b₄, 1b₅, 1b₆, 1c₂, 1c₃, 1c₄, 1c₅

1c₆, 1d₂, 1d₃, 1d₄). Nghiên cứu này tương đồng với nghiên cứu của Zafarullah và đtg (2013) khi tiến hành nhân giống *in vitro* loài *Chrysanthemum indicum* L. trên môi trường MS bổ sung 1 mg/L BA kết hợp với 0,1 mg/L IAA, kết quả cho thấy 80% mẫu tái sinh chồi, số chồi tái sinh 5,20 chồi/mẫu, chất lượng chồi không tốt, chồi có màu xanh nhạt và biểu hiện mọng nước. Trong nhân giống *in vitro* cây hoa cúc, các loài khác nhau thì phù hợp với những môi trường nuôi cấy khác nhau như: Hemlata và Mahdi (2016) nghiên cứu nhân nhanh loài *Chrysanthemum morifolium* cho thấy, môi trường MS bổ sung 3 mg/L BA phối hợp 0,01 mg/L NAA tái sinh chồi cao nhất, với 4,05 chồi/mẫu; Nalini và đtg (2016) nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài *Chrysanthemum grandiflora* Ramat, kết quả cho thấy môi trường MS bổ sung 2 mg/L BA phối hợp 0,5 mg/L NAA là tốt nhất cho sự tái sinh chồi và sinh trưởng chồi.

Như vậy, môi trường MS không bổ sung chất kích thích sinh trưởng là phù hợp cho sự tái sinh và sinh trưởng chồi cây hoa cúc chi.

Ảnh hưởng của than hoạt tính đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro*

Khả năng tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* từ đốt thân sau 30 ngày nuôi cấy được thể hiện trên Bảng 2. Kết quả cho thấy, tất cả các mẫu cây trên môi trường bổ sung và không bổ sung than hoạt tính đều tái sinh chồi, tuy nhiên ở những môi trường khác nhau thì sự tái sinh và sinh trưởng chồi khác nhau. Chiều cao chồi ở môi trường có bổ sung than hoạt tính cao hơn (3,45 cm) môi trường không bổ sung than hoạt tính (2,46 cm) và có sự khác biệt có ý nghĩa. Môi trường không và có bổ sung than hoạt tính đều tái sinh 1 chồi/mẫu. Kết quả nghiên cứu này cũng cho thấy, tất cả các mẫu cây ở môi trường có và không có than hoạt tính đều tạo rễ, tỷ lệ mẫu tạo rễ đạt 100%, điều này cho thấy cây hoa cúc chi là một đối tượng dễ tạo rễ *in vitro*. Rễ của những chồi ở môi trường có than hoạt tính dài hơn (5,24 cm) môi trường không có than hoạt tính (3,62 cm), điều này có thể giải thích than hoạt tính có tác dụng kích thích kéo dài rễ *in vitro*. Kết quả của nghiên cứu này cũng phù hợp với một số nghiên

cứu đã công bố chứng minh than hoạt tính có tác dụng kích sự sinh trưởng chồi và tạo rễ *in vitro* của cây như: Phan Xuân Huyền và đtg (2017) khi nhân giống *in vitro* cây sâm bố chính (*Hibicus sagittifolius* Kurz) thông qua nuôi cấy chồi ngủ đốt thân, kết quả cho thấy, môi trường không có than hoạt tính thì mẫu cây không tạo rễ, nhưng khi bổ sung 1 g/L than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy thì 100% mẫu cây tạo rễ và cây sinh trưởng tốt hơn; Phan Xuân Huyền và Nguyễn Lâm Thanh (2014) nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây đảng sâm (*Codonopsis javanica* Blume) thông qua nuôi cấy chồi ngủ, kết quả chỉ ra rằng môi trường có bổ sung 1 g/L than hoạt tính thì 100% mẫu cây tạo thành cây hoàn chỉnh có thân lá rễ, cây sinh trưởng tốt mà không hình thành

cụm chồi, trong khi đó môi trường không bổ sung than hoạt tính thì 100% mẫu cây tạo cụm chồi mà không hình thành rễ; Phan Xuân Huyền và đtg (2018) khi nghiên cứu nhân giống *in vitro* và ảnh hưởng của phân bón lá đến sinh trưởng cây lan gấm (*Anoectochilus formosanus* Hayata) tại Lâm Đồng đã tiến hành khảo sát ảnh hưởng của 0, 1, 2, 3 và 4 g/L than hoạt tính đến sự tạo rễ *in vitro*, kết quả ghi nhận môi trường bổ sung 1 g/l hoặc 2 g/L than hoạt tính là phù hợp cho sự tạo rễ *in vitro* và sinh trưởng của cây.

Như vậy, sự tái sinh và sinh trưởng chồi cây hoa cúc chỉ ở môi trường MS bổ sung 1 g/L than hoạt tính tốt hơn môi trường không bổ sung than hoạt tính.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA, Kinetin, TDZ đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* sau 30 ngày nuôi cấy

Chất kích thích sinh trưởng (mg/L)			Chiều cao chồi (cm)	Số chồi/mẫu
BA	Kinetin	TDZ		
0,0			2,44 ^{a*}	1,00 ^a
0,1			1,64 ^b	1,00 ^a
0,5			1,18 ^c	1,00 ^a
1,0			0,91 ^d	1,00 ^a
1,5			0,67 ^e	1,00 ^a
2,0			0,63 ^e	1,00 ^a
	0,0		2,41 ^{a*}	1,00 ^a
	0,1		1,49 ^b	1,00 ^a
	0,5		1,01 ^c	1,00 ^a
	1,0		0,96 ^c	1,00 ^a
	1,5		0,48 ^d	1,00 ^a
	2,0		0,50 ^d	1,00 ^a
		0,0	2,47 ^{a*}	1,00 ^a
		0,1	1,24 ^b	1,00 ^a
		0,5	0,98 ^c	1,00 ^a
		1,0	0,69 ^d	1,00 ^a

Chú thích: *Những chữ khác nhau (a, b, c, d, e) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong Duncan's test.

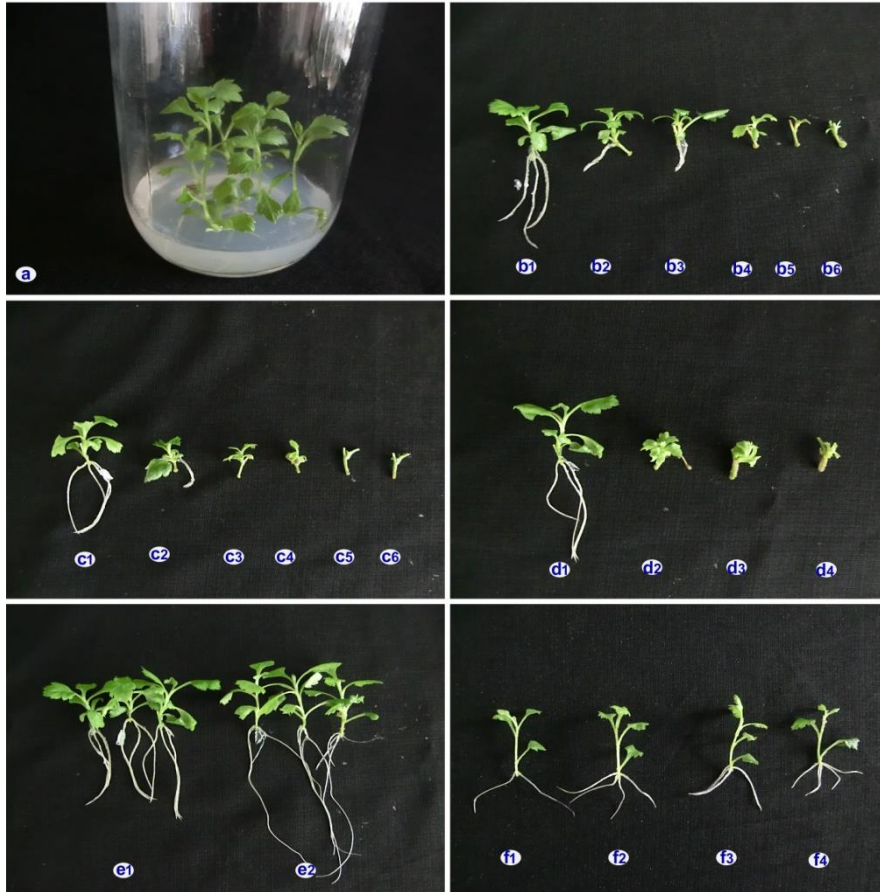
Ảnh hưởng của IBA đến sự tạo rễ *in vitro*

Khả năng tạo rễ *in vitro* của chồi ngọn sau 10 ngày nuôi cấy được thể hiện trên Bảng 3. Kết quả cho thấy, tất cả các mẫu cây trên môi trường bổ

sung và không bổ sung chất kích thích sinh trưởng đều tạo rễ, với tỷ lệ đạt 100%. Tuy nhiên, ở những môi trường khác nhau thì sự tạo rễ khác nhau, khi nồng độ IBA tăng dần (0, 0,1, 0,5 và 1 mg/L) thì số lượng rễ cũng tăng lên (tương ứng 2,20, 3,90, 4,10

và 5,30 rễ/chồi), điều này cho thấy khi tăng nồng độ IBA thì kích thích chồi ngọn tạo nhiều rễ. Kết quả cũng cho thấy, khi tăng dần nồng độ IBA thì

chiều dài của rễ giảm dần, điều này có thể giải thích khi tăng nồng độ IBA thì ức chế sự tăng trưởng theo chiều dài của rễ.



Hình 1: a. Chồi cây hoa cúc chi *in vitro*; b₁, b₂, b₃, b₄, b₅, b₆. Tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* trên môi trường bổ sung 0, 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2 mg/L BA; c₁, c₂, c₃, c₄, c₅, c₆. Tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* trên môi trường bổ sung 0, 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2 mg/L Kinetin; d₁, d₂, d₃, d₄. Tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* trên môi trường bổ sung 0, 0,1, 0,5, 1 mg/L TDZ; e₁, e₂. Tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* trên môi trường bổ sung 0 và 1 g/L than hoạt tính; f₁, f₂, f₃, f₄. Tạo rễ *in vitro* trên môi trường bổ sung 0, 0,1, 0,5, 1 mg/L IBA.

Bảng 2. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* sau 30 ngày nuôi cấy.

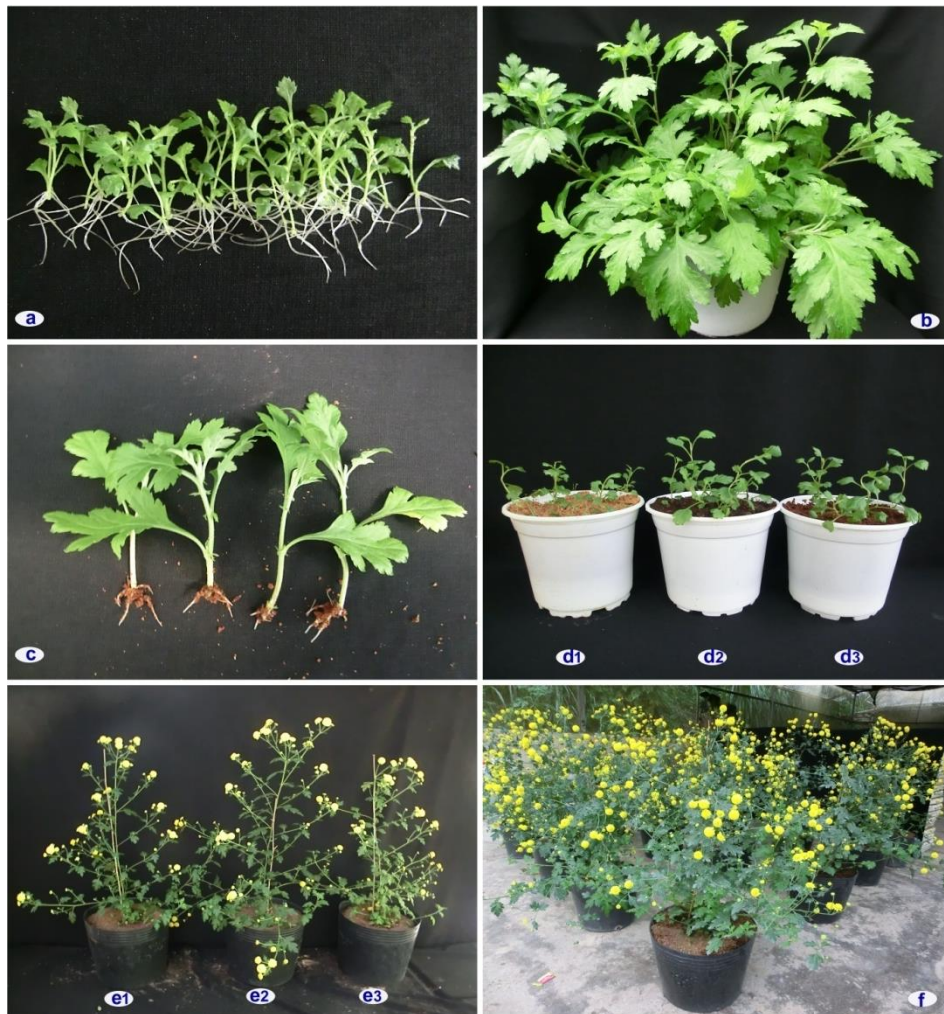
Than hoạt tính (g/L)	Chiều cao chồi (cm)	Số chồi/mẫu	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)
Không than hoạt tính	2,46 ^{b*}	1,00 ^a	3,62 ^b	100
Có than hoạt tính	3,45 ^a	1,00 ^a	5,24 ^a	100

Chú thích: *Những chữ khác nhau (a, b,) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong T-test

Bảng 3. Ảnh hưởng của IBA đến sự tạo rễ *in vitro* sau 10 ngày nuôi cấy.

IBA (mg/L)	Chiều dài rễ (cm)	Số rễ/chồi	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)
0,0	2,36 ^a	2,20 ^c	100
0,1	1,78 ^b	3,90 ^b	100
0,5	1,70 ^b	4,10 ^b	100
1,0	1,37 ^c	5,30 ^a	100

Chú thích: *Những chữ khác nhau (a, b, c) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong Duncan's test



Hình 2. a. Cây hoa cúc chi nuôi cấy mô; b. Cây hoa cúc chi có nguồn gốc từ nuôi cấy mô; c. Nọn cây hoa cúc chi có nguồn gốc từ nuôi cấy mô được xử lý tạo rễ *ex vitro*; d₁, d₂, d₃. Cây hoa cúc chi nuôi cấy mô trồng trên giá thể đất bazan, đất mùn, xun xơ dừa; e₁, e₂, e₃. Cây hoa cúc chi tưới phân Nutri-Gold, Nitrophoska, Phân sinh học Vinh Thanh; f. Sự sinh trưởng phát triển và ra hoa của cây hoa cúc chi trồng trên giá thể xun xơ dừa trong điều kiện nhà kính tại Đà Lạt - Lâm Đồng.

IBA là một trong những chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm auxin có tác dụng tạo rễ *in vitro* và hiện nay đã có nhiều công bố sử dụng chất IBA để tạo rễ *in vitro* trên cây hoa cúc, cũng như những loại cây trồng khác. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy cây hoa cúc chỉ là một đối tượng cây trồng dễ dàng tạo rễ *in vitro*, ở môi trường có và không có chất kích thích sinh trưởng đều tạo rễ, tỷ lệ tạo rễ đạt 100%, trong khi đó Zafarullah và đtg (2013) cũng sử dụng IBA nghiên cứu tạo rễ *in vitro* loài *Chrysanthemum indicum* L. nhưng tỷ lệ tạo rễ cao nhất chỉ đạt 85%, chiều dài rễ 2,5 cm và 2,7 rễ/chồi. Nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Waseem và đtg (2009) khi tiến hành nhân nhanh *in vitro* loài *Chrysanthemum morifolium* đã sử dụng IBA nghiên cứu tạo rễ *in vitro*, kết quả ghi nhận tỷ lệ tạo rễ đạt 100% khi IBA ở nồng độ 0,2 mg/L. Nghiên cứu này cũng phù hợp với nghiên cứu của Phạm Ngọc Minh Quỳnh và Khúc Thị An (2012) khi tiến hành vi nhân giống cây hoa cúc đã sử dụng chất IBA, kết quả cho thấy, khi IBA ở nồng độ 0,7 mg/L thì tỷ lệ tạo rễ đạt 100%.

Như vậy, nồng độ IBA từ 0 - 1 mg/L đều thích hợp cho sự tạo rễ *in vitro* cây hoa cúc chi.

Ảnh hưởng của giá thể đến tỉ lệ sống của cây cấy mô chuyển ra ngoài vườn ươm

Khả năng sống sót và thích nghi của cây hoa cúc cấy mô sau 30 ngày chăm sóc ngoài vườn ươm được thể hiện trên Bảng 4. Nghiên cứu chuyển cây cấy mô ra ngoài vườn ươm là một bước quan trọng trong nuôi cấy mô thực vật. Cây cấy mô thường nuôi cấy trên môi trường thạch khi chuyển ra ngoài vườn ươm bộ rễ phải thích nghi trên giá thể mới, hơn nữa, độ ẩm trong điều kiện *in vitro* cao và ổn định hơn ở điều kiện ngoài vườn ươm. Do đó, cây cấy mô thường bị héo và chết khi chuyển từ điều kiện *in vitro* ra ngoài

vườn ươm, vì vậy, trong thời gian đầu chuyển cây cấy mô ra ngoài vườn ươm cần phun sương đảm bảo độ ẩm cho cây con. Kết quả cho thấy, tỷ lệ sống của cây trồng trên giá thể đất mùn và vụn xơ dừa đạt 100%, trong khi đó cây trồng trên giá thể đất bazan chỉ đạt 80%. Điều này có thể giải thích giá thể đất mùn và vụn xơ dừa có độ thông thoáng và giữ ẩm thích hợp cho cây cấy mô cúc chi sinh trưởng trong giai đoạn đầu khi chuyển ra ngoài vườn ươm. Cây trồng trên giá thể đất bazan sinh trưởng kém nhất, chiều cao cây chỉ đạt 5,98 cm và chiều dài rễ 2,78 cm (Hình 2d₁). Cây trồng trên giá thể đất mùn và vụn xơ dừa sinh trưởng tốt hơn, chiều cao tương ứng đạt 9,78 cm và 9,43 cm (Hình 2d₂, 2d₃) và không có sự khác biệt. Chiều dài rễ của cây trồng trên ba loại giá thể trên có sự khác biệt có ý nghĩa.

Giá thể đất bazan, đất mùn và vụn xơ dừa là những giá thể được sử dụng phổ biến trồng cây con ở giai đoạn vườn ươm. Kết quả của nghiên cứu này phù hợp với nhiều nghiên cứu đã công bố như: Phan Xuân Huyền và Nguyễn Lâm Thanh (2014) nghiên cứu chuyển cây đảng sâm cấy mô ra ngoài vườn ươm đã trồng trên giá thể vụn xơ dừa, kết quả ghi nhận sau 20 ngày nuôi trồng và chăm sóc tỷ lệ sống của cây đạt 100%; Phan Xuân Huyền và Nguyễn Thị Phương Hoàng (2017) khi nghiên cứu trồng cây lan gấm cấy mô của loài *Anoectochilus formosanus* ra điều kiện *ex vitro* cũng đã sử dụng giá thể vụn xơ dừa, kết quả cho thấy, tỷ lệ sống của cây đạt 100% sau 2 tháng nuôi trồng; Một nghiên cứu khác của Phan Xuân Huyền và đtg (2017) cũng sử dụng giá thể vụn xơ dừa trồng cây sâm bố chính cấy mô, kết quả đưa ra, tỷ lệ sống của cây đạt 95% sau 30 ngày nuôi trồng và chăm sóc.

Như vậy, vụn xơ dừa là giá thể thích hợp nhất để chuyển cây hoa cúc chi ra ngoài vườn ươm.

Bảng 4. Ảnh hưởng của giá thể đến tỉ lệ sống của cây cấy mô chuyển ra ngoài vườn ươm sau 30 ngày nuôi trồng.

Giá thể	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Tỉ lệ sống (%)
Đất bazan	5,98 ^b	2,78 ^c	80
Đất mùn	9,78 ^a	4,21 ^b	100
Vụn xơ dừa	9,43 ^a	5,63 ^a	100

Chú thích: *Những chữ khác nhau (a, b, c) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong Duncan's test

Ảnh hưởng của phân bón đến sự sinh trưởng phát triển cây hoa cúc chi trồng trong nhà kính

Khả năng sinh trưởng và phát triển cây hoa cúc chi sau 90 ngày nuôi trồng và chăm sóc được thể hiện trên Bảng 5. Kết quả cho thấy, tất cả những cây cúc chi tưới ba loại phân trên đều sinh trưởng phát triển tốt (Hình 2e₁, 2e₂, 2e₃), tuy nhiên những cây cúc được tưới các loại phân khác nhau thì có sự sinh trưởng phát triển khác nhau. Cây cúc chi tưới phân Nitrophoska sinh trưởng phát triển tốt nhất, chiều cao cây đạt 61,70 cm và tổng số hoa 100,80 hoa/cây, điều này có thể giải thích thành phần và hàm lượng của các chất khoáng đa vi lượng có trong phân Nitrophoska phù hợp cho sự sinh trưởng phát triển của cây hoa cúc chi. Cây cúc chi tưới phân Nutri-Gold và Phân sinh học Vinh Thanh sinh trưởng phát triển kém hơn, chiều cao cây tương ứng 56,67 cm, 51,34 cm và tổng số hoa tương ứng 80,80 hoa/cây, 79,20 hoa/cây. Sự sinh trưởng phát triển của cây cúc tưới ba loại phân trên có sự khác nhau, nhưng đường kính hoa và khối lượng tươi của hoa ở các nghiệm thức trên không có sự khác biệt theo xử lý thông kê số liệu, điều này cho thấy đường kính hoa (1,66 - 1,70 cm) và khối lượng tươi của hoa (0,372 - 0,376 g/hoa) tương đối đồng đều. Các loại cây trồng khác nói chung và cây hoa cúc chi nói riêng đều cần những chất khoáng đa vi lượng thiết yếu cho

cây sinh trưởng phát triển. Kết quả của nghiên cứu này phù hợp với một số nghiên cứu sử dụng phân Nitrophoska bón cho cây trồng đã công bố như: Nguyễn Bá Nam và đtg (2014) khi tiến hành trồng cúc đá vàng, sapphire và kim cương trong nhà kính trên đất bazan đã bón phân Nitrophoska theo định kỳ 10 ngày/lần, kết quả cho thấy, ba loài cúc này sinh trưởng phát triển tốt và đều ra hoa sau 12 tuần nuôi trồng và chăm sóc; Nguyễn Thị Thanh Hằng và đtg (2018) trồng cây dược liệu giảo cổ lam trong chậu (đường kính chậu 15 cm, chiều cao chậu 12 cm) trên giá thể vụn xơ dừa trong nhà kính, tưới 100 mL phân Nitrophoska (2 g/L) vào chậu giá thể theo định kỳ 1 tuần 1 lần, kết quả là cây sinh trưởng phát triển tốt, chiều cao cây đạt 94,22 cm, chiều dài rễ 37,71 cm và khối lượng tươi 59,38 g/cây sau 90 ngày nuôi trồng và chăm sóc; Phan Xuân Huyền và đtg (2017) sử dụng chậu nhựa có đường kính 15 cm, chiều cao 12 cm trồng cây sâm bô chính trên giá thể vụn xơ dừa trong nhà kính, tưới 100 mL phân Nitrophoska (2 g/L) vào chậu giá thể theo định kỳ 1 tuần 1 lần, sau 40 ngày nuôi trồng và chăm sóc, cây sinh trưởng phát triển tốt, chiều cao cây đạt 19,96 cm, sau 80 ngày, cây tiếp tục sinh trưởng phát triển tốt, chiều cao cây đạt 60,82 cm và tất cả các cây đều ra hoa.

Như vậy, tưới phân Nitrophoska là thích hợp nhất cho sự sinh trưởng phát triển cây hoa cúc chi trồng trên giá thể vụn xơ dừa trong nhà kính.

Bảng 5. Ảnh hưởng của các phân bón đến sự sinh trưởng phát triển cây hoa cúc chi trong nhà kính sau 90 ngày nuôi trồng.

Phân bón	Chiều cao cây (cm)	Tổng số hoa/cây	Đường kính hoa (cm)	Khối lượng tươi/hoa (g)
Nutri-Gold	56,67 ^b	80,80 ^b	1,66 ^a	0,372 ^a
Nitrophoska	61,70 ^a	100,80 ^a	1,68 ^a	0,376 ^a
Phân sinh học Vinh Thanh	51,34 ^c	79,20 ^b	1,70 ^a	0,374 ^a

Chú thích: *Những chữ khác nhau (a, b, c) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong Duncan's test

KẾT LUẬN

Môi trường MS không bổ sung chất kích thích sinh trưởng là phù hợp cho sự tái sinh và sinh trưởng chồi cây hoa cúc chi. Môi trường MS

bổ sung 1 g/L than hoạt tính thì mẫu tái sinh và sinh trưởng chồi tốt hơn so với trên môi trường không có than hoạt tính. Trên môi trường MS bổ sung 0 - 1 mg/L IBA đều thích hợp cho sự tạo rễ *in vitro* cây hoa cúc chi. Vụn xơ dừa là giá thể

thích hợp nhất để chuyển cây hoa cúc chi ra ngoài vườn ươm. Tuổi phân Nitrophoska là thích hợp nhất cho sự sinh trưởng phát triển cây hoa cúc chi trồng trên giá thể vụn xơ dừa trong nhà kính. Cây hoa cúc chi phù hợp trồng trong nhà kính tại Đà Lạt - Lâm Đồng, cây sinh trưởng phát triển tốt và ra hoa quanh năm.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hỗ trợ cho chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bhavani R, Yamuna U, Rajeshkumar S (2016) Hepatoprotective activity of aqueous extracts of *Chrysanthemum indicum* flowers on paracetamol induced liver injury in albino rats. *Asian J Pharm Clin Res* 9(3): 246-249.

Chang KM, Choi EM, Kim GH (2010) Chemical constituents of *Chrysanthemum indicum* L. flower oil and effect on Osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Food Sci Biotechnol* 19(3): 815-819.

Duncan DB (1955) Multiple range and F tests. *Biometrics* 11: 1-42.

Eeckhaut T, Van Huylenbroeck J (2011) Development of an optimal culture system for callogenesis of *Chrysanthemum indicum* protoplasts. *Acta Physiol Plant* 33:1547-1551.

Gao MH, Li H, Zhang L, Xiao SX (2008) Studies on chemical constituents from flowers of *Chrysanthemum indicum*. *J Chin Med Mater* 31(5): 682-686.

Hemlata C, Mahdi A (2016) Optimization of plant growth regulators for rapid *Chrysanthemum morifolium* shoot multiplication. *IJSRR* 5(1): 109-114.

Humbarwadi SV, Patel AK (2018) Green synthesis and study on antimicrobial activity of nanoparticles from floral extract of *Chrysanthemum indicum*. *Int J Pharm Biol Sci* 8(4): 1121-1126.

Hussaini B, Tula MY, Onyeje GA, Memi GG, Nne UI (2018) Effect of *Chrysanthemum indicum* aqueous extract on some biochemical and haematological parameters in albino rats. *IJBCCR* 22(4): 1-8.

Jeong SC, Kim SM, Jeong YT, Song CH (2013) Hepatoprotective effect of water extract from

Chrysanthemum indicum L. flower. *Chin Med* 8(7): 1-8.

Kim DS, Goo YM, Cho J, Lee J, Lee DL, Sin SM, Kil YS, Jeong WM, Ko KH, Yang KJ, Kim GYG, Kim SG, Kim K, Kim YJ, Kim JK, Shin EC (2018) Effect of volatile organic chemicals in *Chrysanthemum indicum* on blood pressure and electroencephalogram. *Molecules* 23(8): 1-14.

Murashige T, Skoog F (1962) Arevised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Plant Physiol* 15: 473-497.

Nguyễn Bá Nam, Lê Thị Thanh, Lê Thị Thanh Trà, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Đình Lâm, Dương Tân Nhựt (2014) Ảnh hưởng của ánh sáng đèn led bổ sung vào ban đêm lên sự sinh trưởng và phát triển trên ba giống cúc (đóa vàng, sapphire và kim cương) được trồng trong nhà kính. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 52(3): 311-328.

Nalini R, Anjana JM, Arathi CS, Aswathy M, Ayana B, Bhuvanawari R (2016) Effect of growth regulators on micropropagation of *Chrysanthemum grandiflora* Ramat. *SIRJ-APBBP* 3(4): 7-9.

Nguyễn Thị Thanh Hằng, Lê Ái Vân, Đinh Văn Khiêm, Hoàng Văn Cương, Nguyễn Thị Phương Hoàng, Phan Xuân Huyền (2018) Nghiên cứu nhân giống *in vitro* và sự sinh trưởng phát triển cây giảo cổ lam (*Gynostemma pubescens*) trong nhà kính. *Tạp chí Khoa học Đại học Đà Lạt* 8(3): 99-112.

Phạm Ngọc Minh Quỳnh, Khúc Thị An (2012) Vi nhân giống cây hoa cúc (*Chrysanthemum* sp.) tại trường Đại học Nha Trang. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản* 2: 1-6.

Phan Xuân Huyền, Nguyễn Lâm Thanh (2014) Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây đàng sâm (*Codonopsis javanica* Blume) thông qua nuôi cấy chồi ngủ. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 12(4): 659-666.

Phan Xuân Huyền, Huỳnh Thị Ngoan, Nguyễn Thị Phương Hoàng (2017) Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây sâm bố chính (*Hibicus sagittifolius* Kurz) thông qua nuôi cấy chồi ngủ đốt thân. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam* 15(5): 664-672.

Phan Xuân Huyền, Nguyễn Thị Phương Hoàng (2017) Nghiên cứu tái sinh chồi *in vitro* và nuôi trồng cây lan gấm (*Anoectochilus formosanus* Hayata). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 15(3): 515-524.

Phan Xuân Huyền, Trần Thị Hoàn Anh, Nguyễn Thị Phương Hoàng, Nguyễn Thị Thanh Hằng, Đinh Văn

Khiêm, Hoàng Văn Cường (2018) Nghiên cứu nhân giống *in vitro* và ảnh hưởng của phân bón lá đến sinh trưởng cây lan gấm (*Anoectochilus formosanus* Hayata) tại Lâm Đồng. *Tạp chí Dược liệu* 23(1): 52-59.

Rivai RR, Helmanto H (2015) Callus Induction of *Chrysanthemum indicum* for increasing genetic diversity from somatic cell. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon* 1(1): 167-170.

Rajalashmi G, Komathi S, Banu R, Poongodi N, Sasikala T (2013) Micropropagation and antimicrobial activity of *Chrysanthemum indicum*. *Sch Acad J Pharm* 2(4): 285-288.

Võ Văn Chi (1997) Từ điển Cây thuốc Việt Nam.

NXB Y học.

Waseem K, Jilani MS, Khan MS (2009) Rapid plant regeneration of *Chrysanthemum morifolium* L.) through shoot tip culture. *Afr J Biotechnol* 8(9): 1871-1877.

Wu LY, Gao HZ, Wang XL, Ye JH, Lu JL, Liang YR (2010) Analysis of chemical composition of *Chrysanthemum indicum* flowers by GC/MS and HPLC. *J Med Plant Res* 4(5): 421-426.

Zafarullah A, Ilyas S, Naz S, Aslam F, Manzoor F (2013) Effect of culture media and growth regulators on *in vitro* propagation of *Chrysanthemum indicum* L. *Pakistan J Sci* 65: 461-466.

IN VITRO PROPAGATION AND GROWTH OF EX VITRO CHRYSANTHEMUM INDICUM L. IN DA LAT - LAM DONG

Phan Xuan Huyen, Truong Ngoc Thao Vy, Nguyen Thi Phuong Hoang, Nguyen Thi Thanh Hang, Dinh Van Khiem

Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Chrysanthemum indicum plant is a valuable and beneficial herb for human health. In this paper, we present the results of *in vitro* propagation of this plant in Da Lat. The results showed that MS medium supplemented with 25 g/l sucrose, 9 g/l agar, pH 5.8 was the best for shoot regeneration and growth (shoot height was 2.41 - 2.47 cm, 1 shoot/explant). MS media supplemented with BA (0.1, 0.5, 1, 1.5, 2 mg/l), Kinetin (0.1, 0.5, 1, 1.5, 2 mg/l) and TDZ (0.1, 0.5, 1 mg/l) were unsuitable for shoot regeneration and growth of *C. indicum*. The regeneration and growth of shoots on the medium supplemented with 1 g/l of activated charcoal was better than (plant height of 3.45 cm) medium without activated charcoal (plant height of 2.46 cm). MS medium supplemented with 0, 0.1, 0.5, 1 mg/l IBA, 25 g/l sucrose, 9 g/l agar, pH 5,8 were suitable for *in vitro* root regeneration, rate of root formation was 100%. Coconut fiber powder was the best substrate to transfer the plantlets to the greenhouse, with survival rate of 100%, plantlets grew well. Nitrophoska irrigation was the best for the growth and development of *C. indicum* cultivated on coconut fiber powder under greenhouse conditions (plant height of 61.70 cm, 100.80 flowers/tree, flower diameter of 1.68 cm, fresh weight of 0.376 g/flower). The results also show that seedlings derived from tissue culture can be used to cultivate *C. indicum* and *C. indicum* grew well in the climate of Da Lat - Lam Dong and flowered all year round.

Keywords: *Chrysanthemum indicum* L., development, growth, root formation, shoot regeneration.