

Nghiên cứu nhân nhanh hai giống cúc đồng tiền cổ (*Gerbera jamesonii* Bolus) bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*

Phan Thị Thu Hiền¹, Nguyễn Thị Kim Anh¹, Lê Thị Tuyết Châm², Vũ Thị Thúy Hằng^{2*}

¹Khoa Sinh - Kỹ thuật Nông nghiệp, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2, đường Nguyễn Văn Linh, phường Xuân Hoà, TP Phúc Yên, tỉnh Vĩnh Phúc, Việt Nam

²Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 2/9/2022; ngày chuyển phản biện 5/9/2022; ngày nhận phản biện 28/9/2022; ngày chấp nhận đăng 2/10/2022

Tóm tắt:

Nụ hoa cúc đồng tiền được khử trùng kép có, tỷ lệ tạo mẫu sạch lên đến 90% với cúc đồng tiền cánh vàng cổ và 92% với cúc đồng tiền cánh hồng cổ. Với môi trường bổ sung 1,5 mg/l BAP và 2 mg/l TDZ, giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ thu được tỷ lệ tái sinh đạt 52,17%, giống cúc đồng tiền cánh hồng cổ thu được tỷ lệ tái sinh đạt 53,85%. Khi sử dụng IBA 1,5 mg/l kết hợp với BA 2 mg/l, giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ thu được tỷ lệ tạo chồi là 44,45%, trung bình 5 chồi/mẫu; cúc đồng tiền cánh hồng cổ đạt tỷ lệ tạo chồi 46,15%, trung bình 6 chồi/mẫu. Môi trường có 0,05 mg/l NAA và 0,3 mg/l IBA tạo 6-7 rễ, chiều dài khoảng 2,5 cm; nhiệt độ 20-25°C thích hợp nhất để cho ra rễ ở 2 giống cúc đồng tiền cổ. Cây con sau khi tạo rễ được đưa ra ươm trồng với giá thể gồm 50% cát + 30% đất + 20% trấu hun, tỷ lệ cây sống sau 8 tuần đạt 98,26%, chiều cao đạt 14,8 cm với giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ; 99,05%, chiều cao đạt 12,6 cm với giống cúc đồng tiền cánh hồng cổ.

Từ khóa: cúc đồng tiền cổ, *Gerbera jamesonii* Bolus, *in vitro*, nhân nhanh.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Cúc đồng tiền có tên khoa học là *Gerbera Jamesonii* Bolus có nguồn gốc từ Nam Phi. Đến nay, cúc đồng tiền được trồng ở nhiều nước trên thế giới, điển hình như Hà Lan, Mỹ, Đức, Nhật Bản, Trung Quốc... Cúc đồng tiền có nhiều chủng loại từ hình dáng thân cao, trung bình, thấp đến đa dạng với nhiều màu sắc khác nhau như đỏ, cam, vàng, trắng, phấn hồng, tím... Trên một bông hoa có thể có một màu đơn hoặc nhiều màu xen kẽ. Cúc đồng tiền có cuống hoa to, là hoa lý tưởng để làm bó hoa, lẵng hoa và cắm nghệ thuật rất được ưa chuộng [1]. Trong sản xuất, cây cúc đồng tiền là loài hoa có giá trị kinh tế cao. Trong các loài cúc đồng tiền đã và đang được trồng tại Việt Nam thì cúc đồng tiền kép nhập nội là một trong những cây cho hiệu quả kinh tế cao nhất. Loại cúc đồng tiền giống mới này khi chăm sóc đúng kỹ thuật có thể cho thu nhập gần 50 triệu đồng/sào/năm [2]. Hơn thế nữa, cúc đồng tiền có thể trồng một lần và cho thu hoạch quanh năm. Nếu tính giá trị trên từng bông, cúc đồng tiền không cao như hoa phăng, lily, lay ơn... Tuy nhiên, hiệu quả kinh tế thu được trên một đơn vị diện tích trồng loại cúc đồng tiền này lại khá cao.

Cho đến nay, có nhiều công trình nghiên cứu vi nhân giống cây hoa cúc đồng tiền đã được công bố [2-9]. Hoa cúc đồng tiền có thể được nhân nhanh bằng 2 phương pháp: hữu

tính và vô tính bằng phương pháp vi nhân giống trong điều kiện *in vitro*. Nhược điểm của phương pháp nhân hữu tính là mất nhiều thời gian, trong khi nhân nhanh trong điều kiện *in vitro* lại là giải pháp tạo ra lượng cây giống nhiều trong thời gian ngắn, sạch bệnh và đồng đều [1, 3]. Có nhiều vật liệu thực vật sử dụng để nhân nhanh, tái sinh trực tiếp từ đỉnh sinh trưởng hoặc chồi hoa, vật liệu cũng có thể là nụ hoa non, tạo ra mô sẹo sau đó tái sinh thành đa chồi trong điều kiện *in vitro* [8].

Trong quá trình nhân giống cây cúc đồng tiền, giai đoạn khó nhất là vào mẫu và ra ngôi ngoài vườn ươm. Do đó, giải quyết được 2 bước này sẽ giải quyết được bài toán hiệu quả sản xuất thực tế. Trên thế giới và Việt Nam đã có nhiều công bố về nhân giống *in vitro* ở các giống cúc đồng tiền khác nhau, tuy nhiên chưa có công bố nào nghiên cứu về việc nhân nhanh và lưu trữ các giống đồng tiền cổ được thu thập ở Việt Nam.

Nghiên cứu này sử dụng nụ hoa non làm vật liệu khởi đầu vào mẫu để nâng cao phẩm chất và khả năng nhân nhanh cây giống nhằm cung cấp lượng cây giống tốt, đồng đều và sạch bệnh. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu cũng góp phần lưu giữ và bảo tồn nguồn gen các giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ và cánh hồng cổ.

*Tác giả liên hệ: Email: vtthang.nh@vnua.edu.vn

***In vitro* rapid multiplication of two ancient gerbera varieties (*Gerbera jamesonii* Bolus)**

**Thi Thu Hien Phan¹, Thi Kim Anh Nguyen¹,
Thi Tuyet Cham Le², Thi Thuy Hang Vu^{2*}**

¹Faculty of Biology and Agricultural Engineering, Hanoi Pedagogical University 2,
Nguyen Van Linh Street, Xuan Hoa Ward, Phuc Yen City, Vinh Phuc Province, Vietnam

²Faculty of Agronomy, Vietnam National University of Agriculture,
Trau Quy Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

Received 2 September 2022; revised 28 September 2022; accepted 2 October 2022

Abstract:

Gerbera buds are double sterilised, the clean sample rate is up to 90% (ancient yellow gerbera daisies) and 92% (ancient pink gerbera daisies). With the medium supplemented with 1.5 mg/l BAP and 2 mg/l TDZ, the yellow gerbera daisy variety obtained a regeneration rate of 52.17%. Ancient pink gerbera daisies have a regeneration rate of 53.85%. When using 1.5 mg/l IBA combined with 2 mg/l BA, the gerbera daisies obtained a bud formation rate of 44.45% with an average number of 5 buds/sample; ancient pink gerbera daisies achieved a high bud formation rate of 46.15%, with an average number of 6 buds/sample. Media with 0.05 mg/l NAA and 0.3 mg/l IBA produced 6-7 roots, about 2.5 cm in length; the temperature of 20-25°C was most suitable for rooting in 2 varieties of gerbera daisy. After forming roots, the plantlets were planted in a substrate consisting of 50% sand + 30% soil + 20% smoked rice husks. The survival rate after 8 weeks, the height of the ancient yellow gerbera daisies and ancient pink gerbera daisies reached 98.26%, 14.8 cm and 99.05%, 12.6 cm, respectively.

Keywords: ancient gerbera daisies, *Gerbera jamesonii* Bolus, *in vitro*, rapid multiplication.

Classification number: 4.6

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Nụ hoa non của giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ và cánh hồng cổ được cung cấp bởi Công ty TNHH Florist Việt Nam.

Các hóa chất thông dụng trong nuôi cấy mô tế bào thực vật như: các chất khử trùng (xà phòng, cồn 90°, $\text{Ca}(\text{OCl}_2)_2$ 10%, HgCl_2 ...), các hóa chất trong thành phần môi trường MS cơ bản, các chất điều hòa sinh trưởng (BAP, NAA...).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành trong phòng thí nghiệm có các điều kiện môi trường vật lý như sau: số giờ chiếu sáng là 10 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 2000-3000 lux, nhiệt độ phòng nuôi $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Tạo mẫu sạch *in vitro*: Các mẫu được lựa chọn kỹ, loại bỏ các tế bào chết xung quanh và rửa sạch dưới vòi nước chảy trong 20 phút, ngâm trong nước tẩy rửa Lifeboy 10 phút, sau đó để dưới vòi nước chảy trong 4-6 giờ. Mẫu được đưa vào Box cấy, rửa lại 5-6 lần bằng nước cất vô trùng và lắc trong dung dịch $\text{Ca}(\text{OCl}_2)_2$ 10% trong 7-8 phút, sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng 3-5 lần, tiếp theo lắc trong dung dịch HgCl_2 0,1% trong 2-3 phút và cuối cùng rửa lại 6 lần bằng nước cất vô trùng. Mẫu cấy sau đó được sử dụng để đánh giá khả năng tạo mô sẹo phôi hóa và tái sinh cây trong điều kiện từ nụ hoa non [8].

Tối ưu hoá khả năng tái sinh chồi: Những nụ hoa có chiều cao 0,5-2 cm của các cây cúc đồng tiền khỏe mạnh, không bị biến dị, có màu sắc hoa đẹp... được tuyển chọn từ vườn ươm của Công ty TNHH Florist Việt Nam, sau khi khử trùng được đưa vào cấy trên môi trường cảm ứng tạo mô sẹo. Mẫu được nuôi cấy trên môi trường MS + BAP (3 mg/l) + NAA (0,5 mg/l) + TDZ (0,05 mg/l) trong điều kiện tối hoàn toàn, sau đó tiến hành theo dõi tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa phát sinh từ nụ hoa non [8].

Tối ưu hoá khả năng ra rễ *in vitro*: Chồi đạt kích thước chiều cao 3-5 cm được chuyển sang môi trường kích thích tạo rễ: MS có bổ sung IBA, NAA nồng độ khác nhau, pH 5,8. Sau đó, cây được trồng trên giá thể ngoài môi trường [8].

Tối ưu hoá điều kiện rèn luyện, nhiệt độ đến khả năng sống của cây con: Nhiệt độ tối ưu quyết định khả năng sống của cúc đồng tiền trong khoảng nhiệt độ từ 12 đến 36°C .

Tối ưu hoá thành phần giá thể đến khả năng sống và phát triển của cây con: Chồi tạo rễ hoàn chỉnh được đưa ra ngoài môi trường vào các giá thể có thành phần với tỷ lệ khác nhau bao gồm: cát sông, trấu hun, xơ dừa.

Bảng 1. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất khử trùng $\text{Ca}(\text{OCl}_2)_2$ 10% và HgCl_2 0,1% đến khả năng tạo mẫu sạch.

Công thức thí nghiệm	Cách tiến hành	Cúc đồng tiền cánh vàng cổ				Cúc đồng tiền cánh hồng cổ			
		Số lượng mẫu ban đầu	Số mẫu nhiễm sau 4 tuần	Số mẫu sạch sau 4 tuần	Tỷ lệ tạo mẫu sạch (%)	Số lượng mẫu ban đầu	Số mẫu nhiễm sau 4 tuần	Số mẫu sạch sau 4 tuần	Tỷ lệ tạo mẫu sạch (%)
Đôi chứng	Xử lý sơ bộ	51	50	1	1,96	52	50	3	5,77
1	Xử lý sơ bộ, HgCl_2 0,1% 1 phút	53	44	9	16,98	52	40	12	23,07
2	Xử lý sơ bộ, HgCl_2 0,1% 2 phút	53	35	18	33,96	51	37	14	27,45
3	Xử lý sơ bộ, HgCl_2 0,1% 3 phút	50	32	18	36,00	53	32	21	39,62
4	Xử lý sơ bộ, $\text{Ca}(\text{OCl}_2)_2$ 10% 5-6 phút HgCl_2 0,1% 2 phút	51	30	21	41,17	50	31	19	38,00
5	Xử lý sơ bộ, $\text{Ca}(\text{OCl}_2)_2$ 10% 7-8 phút, HgCl_2 0,1% 2-3 phút	50	5	45	90,00	50	4	46	92,00

3. Kết quả và bàn luận

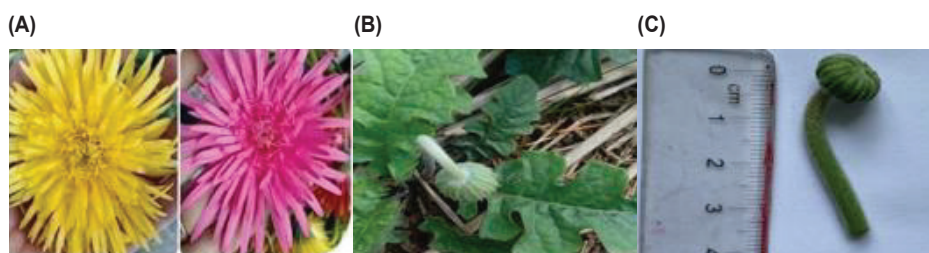
3.1. Kết quả nghiên cứu quá trình nhân nhanh 2 giống cúc đồng tiền cổ

3.1.1. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất khử trùng đến tỷ lệ sống của mẫu cấy

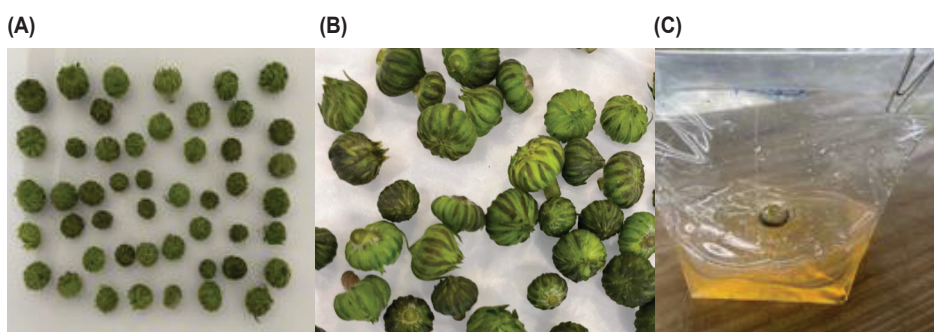
Mỗi loại hóa chất khử trùng có tác dụng tiêu diệt đối với những loại vi sinh vật (nấm, khuẩn) khác nhau. Tác dụng của mỗi loại hóa chất đối với vi sinh vật tùy thuộc vào nồng độ và thời gian khử trùng bằng hóa chất đó. Vì vậy, việc lựa chọn loại hóa chất, nồng độ và thời gian khử trùng là rất quan trọng. Nó quyết định đến sự thành công hay thất bại trong việc khử trùng. Nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá hiệu quả khử trùng của một số hóa chất thường sử dụng để khử trùng ($\text{Ca}(\text{OCl}_2)_2$, HgCl_2 ...) trên 2 mẫu giống cúc đồng tiền cổ. Kết quả thể hiện ở bảng 1.

Kết quả bảng 1 cho thấy, công thức 5 cho kết quả tạo mẫu sạch cao nhất. Các nụ hoa đạt tiêu chuẩn sẽ được rửa sạch dưới vòi nước chảy trong 20 phút, ngâm trong nước tẩy rửa Lifeboy 10 phút, sau đó được để dưới vòi nước chảy trong 4-6 giờ. Mẫu sau khi xử lý sơ bộ được đưa

vào buồng cấy, rửa lại 5-6 lần bằng nước cất vô trùng và lắc trong dung dịch $\text{Ca}(\text{OCl}_2)_2$ 10% trong 7-8 phút, sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng 3-5 lần, tiếp theo lắc trong dung dịch HgCl_2 0,1% trong 2-3 phút, cuối cùng rửa lại 6 lần bằng nước cất vô trùng cho kết quả tạo mẫu sạch tốt nhất. Như vậy, công thức 5 là tối ưu nhất thu được tỷ lệ mẫu sạch lên đến 90% (cúc đồng tiền cánh vàng cổ) và 92% (cúc đồng tiền cánh hồng cổ) (hình 1 và 2).



Hình 1. Mẫu được sử dụng nuôi cấy. (A) 2 loại cúc đồng tiền cánh vàng cổ và cúc đồng tiền cánh hồng cổ; **(B)** Nụ đạt yêu cầu sử dụng vào mẫu; **(C)** Kích thước nụ khi thu mẫu.



Hình 2. Mẫu cấy sau khi đã khử trùng. (A) Mẫu sau khi xử lý sơ bộ; **(B)** Mẫu sau khi đã xử lý với $\text{Ca}(\text{OCl}_2)_2$ 10% 7-8 phút và HgCl_2 0,1% trong 2-3 phút; **(C)** Mẫu đưa vào nuôi trường tạo chồi mẫu ban đầu.

Bảng 2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi (trực tiếp hoặc gián tiếp).

Công thức thí nghiệm	Chất điều tiết sinh trưởng		Cúc đồng tiền cánh vàng cổ			Cúc đồng tiền cánh hồng cổ				
	BAP (mg/l)	TDZ (mg/l)	Số lượng mẫu cấy chuyển	Số mẫu tạo chồi sau 4 tuần	Tỷ lệ tạo chồi sau 4 tuần (%)	Số lượng chồi/mẫu	Số lượng mẫu cấy chuyển	Số mẫu tạo chồi sau 4 tuần	Tỷ lệ mẫu tạo chồi sau 4 tuần (%)	Số lượng chồi/mẫu
Đối chứng	0	0	26	1	3,85	1	26	1	3,81	0
CT1	0,5	1	23	2	8,69	2	24	3	12,50	3
CT2	1	1,5	24	1	4,17	2	24	2	8,33	6
CT3	1,5	2	23	12	52,17	5	26	14	53,85	6
CT4	2	2,5	21	7	33,33	3	26	8	30,77	4
CT5	2,5	3	24	5	20,83	4	26	6	23,08	4

3.1.2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi (trực tiếp hoặc gián tiếp)

Tái sinh chồi là công đoạn rất quan trọng trong nhân giống cây trồng nói chung và nhân giống hoa cúc đồng tiền nói riêng. Kết thúc giai đoạn tạo callus tốt (có màu vàng, sáng) được cấy chuyển callus sang môi trường tái sinh chồi. Kết quả thử nghiệm ảnh hưởng của các chất điều tiết sinh trưởng như: BAP, TDZ đến sự tái sinh chồi từ mô sẹo được tổng hợp ở bảng 2.

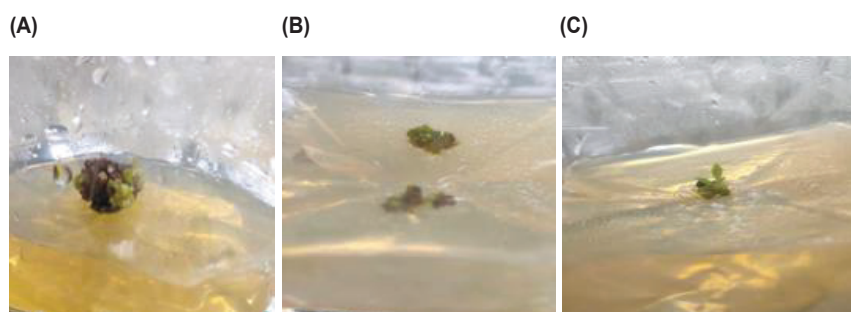
Kết quả bảng 2 cho thấy, các công thức thí nghiệm đều có tỷ lệ bật chồi cao hơn đối chứng không bổ sung chất điều tiết sinh trưởng (không bật chồi). Điều đó chứng tỏ BAP, TDZ có tác dụng thúc đẩy sự tái sinh chồi từ callus của cúc đồng tiền. Các công thức nhìn chung có tỷ lệ tái sinh chồi từ

callus không cao. Khi nồng độ BAP tăng từ 0,5 đến 2,5 mg/l và TDZ tăng từ 1 đến 3 mg/l cho tỷ lệ bật chồi tăng từ 4,17 lên 52,17% đối với giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ và tăng từ 8,33 đến 53,85% đối với giống cúc đồng tiền cánh hồng cổ, số lượng chồi tăng từ 3 đến 6 chồi/mẫu. Công thức 3 có bổ sung 1,5 mg/l BAP và 2 mg/l TDZ có tỷ lệ bật chồi cao nhất đối với cả 2 giống là 52,17 và 53,85%, có số chồi tái sinh 12 chồi/mẫu đối với loại cúc đồng tiền cánh vàng cổ và 6 chồi/callus đối với cúc đồng tiền cánh hồng cổ.

Từ kết quả trên cho thấy, sử dụng BAP và TDZ có thể kích thích callus bật chồi. Nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thích hợp nhất cho tái sinh chồi là 1,5 mg/l BAP và 2 mg/l TDZ đối với cả 2 giống cúc đồng tiền cổ nghiên cứu (hình 3 và 4).

3.1.3. Kết quả ảnh hưởng của một số chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh của chồi cúc đồng tiền

Các cụm chồi thu được ở giai đoạn 1 được đưa vào để nhân nhanh. Các cụm chồi được cắt bỏ phần lá, giữ lại phần gốc có độ dài khoảng 1 cm, được tách nhỏ sao cho mỗi cụm chứa 3-5 chồi rồi tiến hành cấy vào môi trường đã chuẩn bị ở trên. Các mẫu được nuôi cấy trong điều kiện môi trường với quang chu kỳ 12 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 1500 lux và nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ để thu được các cụm chồi của cây cúc đồng tiền trong 4 tuần nuôi cấy. Quá trình được lặp lại đến khi đạt được số lượng mong muốn để tiến hành giai đoạn tạo cây con hoàn chỉnh. Kết quả thử nghiệm ảnh hưởng của các chất điều tiết sinh trưởng như: IBA, BA... đến khả năng nhân nhanh của chồi cúc đồng tiền được thể hiện ở bảng 3.



Hình 3. Mẫu cúc đồng tiền cánh vàng cổ tái sinh sau 4 tuần. (A) Đế hoa sau 6 tuần vào mẫu; **(B)** Mô sẹo tạo chồi; **(C)** Chồi tái sinh sau 4 tuần.



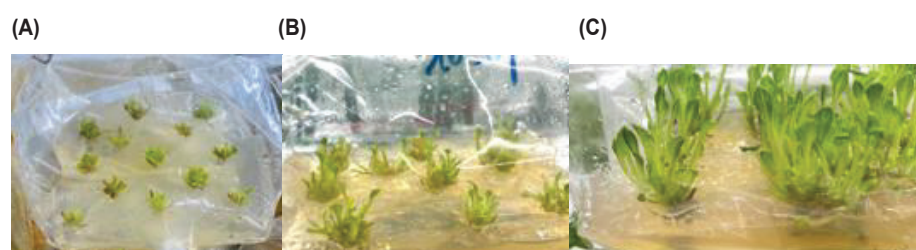
Hình 4. Mẫu cúc đồng tiền cánh hồng cổ tái sinh sau 4 tuần. (A) Mô sẹo sau 6 tuần; **(B)** Mô sẹo tạo chồi; **(C)** Chồi tái sinh sau 4 tuần.

Bảng 3. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh của chồi cúc đồng tiền.

Công thức thí nghiệm	Chất điều tiết sinh trưởng		Cúc đồng tiền cánh vàng cổ			Cúc đồng tiền cánh hồng cổ				
	IBA (mg/l)	BA (mg/l)	Số lượng mẫu ban đầu	Số mẫu tạo chồi sau 4 tuần	Tỷ lệ tạo chồi sau 4 tuần (%)	Số lượng chồi/ mẫu	Số lượng mẫu ban đầu	Số mẫu tạo chồi sau 4 tuần	Tỷ lệ mẫu tạo chồi sau 4 tuần (%)	Số lượng chồi/mẫu
Đối chứng	0	0	27	0	0	0	26	0	0	0
CT1	0,5	1	26	1	3,85	1	24	1	4,17	1
CT2	1	1,5	27	1	3,7	2	26	2	7,69	6
CT3	1,5	2	27	12	44,45	5	26	12	46,15	6
CT4	2	2,5	26	8	30,77	3	26	5	19,23	4
CT5	2,5	3	26	3	11,54	4	26	4	15,38	4

Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi sử dụng chất điều hoà sinh trưởng IBA với nồng độ thay đổi từ 0,5 đến 2,5 mg/l kết hợp với nồng độ BA thay đổi từ 1 đến 3 mg/l cho thấy, tỷ lệ tạo chồi tốt nhất ở cả 2 giống cúc đồng tiền là khi sử dụng IBA 1,5 mg/l và BA 2 mg/l. Mẫu cúc đồng tiền cánh vàng cổ đạt tỷ lệ tạo chồi cao nhất sau 4 tuần là 44,45% với số lượng chồi/mẫu trung bình là 5 chồi. Còn đối với giống cúc đồng tiền cánh hồng cổ tỷ lệ tạo chồi cao nhất đạt 46,15% với số lượng chồi/mẫu trung bình đạt 6 chồi. Các chồi đều khoẻ mạnh và có thể sử dụng cấy nhân tiếp tục ra rễ (hình 5 và 6).

Như vậy, các chất điều hoà sinh trưởng được sử dụng để nhân nhanh 2 giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ và cúc đồng tiền cánh hồng cổ đạt kết quả tốt nhất là IBA 1,5 mg/l kết hợp với BA 2 mg/l.



Hình 5. Mẫu cúc đồng tiền cánh vàng cổ sau 4 tuần nuôi cấy. (A) Mẫu mới cắt nhân; (B) Mẫu cắt nhân sau 1 tuần; (C) Mẫu cắt nhân sau 4 tuần.



Hình 6. Mẫu cúc đồng tiền cánh hồng cổ sau 4 tuần nuôi cấy. (A) Mẫu mới cắt nhân; (B) Mẫu cắt nhân sau 1 tuần; (C) Mẫu cắt nhân sau 4 tuần.

3.1.4. Kết quả ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng đến khả năng ra rễ *in vitro*

Chồi cúc đồng tiền được chuyển sang môi trường ra rễ để tạo cây hoàn chỉnh và trồng vào bầu huấn luyện ngoài môi trường tự nhiên. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng công thức ra rễ *in vitro* với thành phần: MS có bổ sung IBA, NAA với các nồng độ khác nhau: bổ sung nước dừa 10%, than hoạt tính 1,0 g/l, đường 30 g/l, thạch 6,5 g/l, độ pH 6,2 (bảng 4).

Kết quả bảng 4 cho thấy, các công thức thí nghiệm trên đều có tỷ lệ ra rễ cao hơn đối chứng không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng (không ra rễ). Điều đó chứng tỏ, NAA và IBA có tác dụng thúc đẩy sự ra rễ của các chồi cây cúc đồng tiền. Tuy nhiên, số lượng, chiều dài và màu sắc của rễ phụ

thuộc vào từng nồng độ các chất điều hoà sinh trưởng được bổ sung. Khi nồng độ NAA tăng từ 0,03 đến 0,07 mg/l và IBA tăng từ 0,2 đến 0,4 mg/l thì số lượng rễ/chồi tăng từ 3 lên 6 đối với giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ và tăng từ 3 đến 7 đối với giống cúc đồng tiền cánh hồng cổ. Chiều dài của rễ tăng lần lượt từ 1,1 và 1,2 đến 2,5 cm đối với cả 2 giống cúc đồng tiền. Các công thức 3-5 đều cho số lượng rễ và chiều dài trung bình rễ khá tốt. Tuy nhiên, quan sát màu sắc của rễ cho thấy, rễ khoẻ mạnh và phát triển nhanh nhất là khi rễ có màu trắng. Như vậy, công thức 3 có bổ sung 0,05

Bảng 4. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng IBA, NAA đến khả năng tạo rễ *in vitro*.

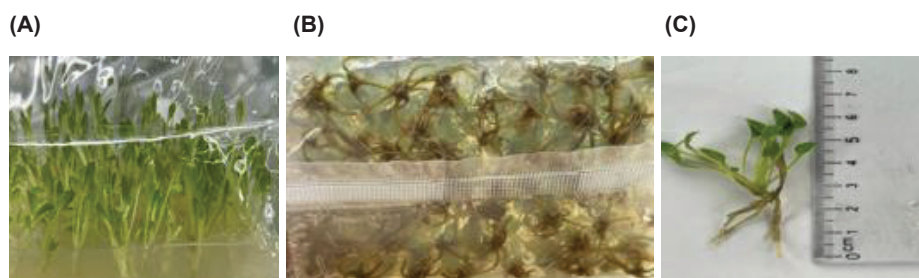
Công thức thí nghiệm	Chất điều tiết sinh trưởng		Cúc đồng tiền cánh vàng cổ			Cúc đồng tiền cánh hồng cổ				
	NAA (mg/l)	IBA (mg/l)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ/cây	Chiều dài trung bình rễ sau 3 tuần (cm)	Màu sắc rễ	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ/cây	Chiều dài trung bình rễ sau 3 tuần (cm)	Màu sắc rễ
Đối chứng	0	0	23,32	3	1,2	Trắng	30,05	4	1,1	Trắng
CT1	0,03	0,2	95,08	3	1,3	Trắng	95,86	3	1,2	Trắng
CT2	0,04	0,25	96,83	5	1,5	Trắng	97,04	5	2,5	Trắng
CT3	0,05	0,3	98,75	6	2,5	Trắng	99,07	7	2,5	Trắng
CT4	0,06	0,35	97,03	6	2	Nâu	97,56	6	2,3	Nâu
CT5	0,07	0,4	95,98	5	2,3	Nâu	96,34	7	2,5	Nâu

mg/l NAA và 0,3 mg/l IBA là công thức cho ra rễ tốt nhất đối với cả 2 giống đồng tiền. Ở công thức này, số lượng rễ/chồi ở cúc đồng tiền cánh vàng cổ là 6 rễ và chiều dài trung bình của các rễ sau 3 tuần là 2,5 cm, rễ có màu trắng. Còn ở cúc đồng tiền cánh hồng cổ có số rễ/chồi là 7, chiều dài trung bình của rễ là 2,5 cm, màu trắng.

Từ kết trên cho thấy, việc sử dụng NAA và IBA có thể kích thích ra rễ tốt nhất. Nồng độ chất điều hoà sinh trưởng thích hợp nhất cho việc ra rễ là 0,05 mg/l NAA và 0,3 mg/l IBA đối với cả 2 giống cúc đồng tiền cổ nghiên cứu (hình 7 và 8).



Hình 7. Mẫu cúc đồng tiền cánh vàng cổ cho ra rễ sau 4 tuần nuôi cấy. (A) Mẫu bắt đầu cắt chuyển sang môi trường ra rễ; **(B)** Mẫu cho ra rễ sau 4 tuần; **(C)** Mẫu rễ trước khi cho ra giá thể.



Hình 8. Mẫu cúc đồng tiền cánh hồng cổ cho ra rễ sau 4 tuần nuôi cấy. (A) Mẫu bắt đầu cắt chuyển sang môi trường ra rễ; **(B)** Mẫu cho ra rễ sau 4 tuần; **(C)** Mẫu rễ trước khi cho ra giá thể.

3.2. Ảnh hưởng của các điều kiện rèn luyện và giá thể đến sinh trưởng phát triển của cây con sau nuôi cấy *in vitro*

3.2.1. Kết quả ảnh hưởng của điều kiện rèn luyện, nhiệt độ đến khả năng sống của cây con

Sau khi cây con đã được rửa sạch thì được đưa ra ươm trồng trên vỉ xốp, vỉ nhựa... có chứa giá thể xơ dừa (giá thể dùng cho việc ươm cây con). Cây được đặt trên giàn cao cách mặt đất 60-80 cm để trong nhà kính vườn ươm, với các điều kiện được điều chỉnh tối ưu: về nhiệt độ và độ ẩm

không khí, ánh sáng được điều chỉnh tăng dần phù hợp với từng giai đoạn độ tuổi của cây. Sau khi điều chỉnh nhiệt độ tối ưu quyết định khả năng sống của cúc đồng tiền thu được kết quả ở bảng 5.

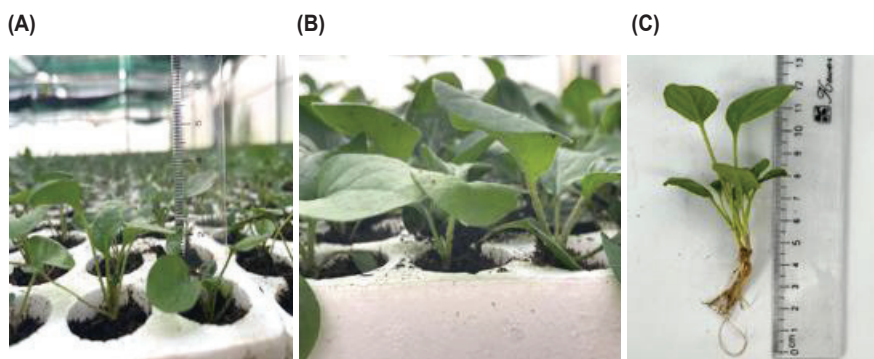
Kết quả bảng 5 cho thấy, nhiệt độ là nhân tố rất quan trọng, ảnh hưởng trực tiếp đến sự sinh trưởng và phát triển của cúc đồng tiền. Các công thức nhìn chung đều thể hiện, cây cúc đồng tiền có tỷ lệ sống cao khi đưa ra ngoài môi trường với các mức nhiệt độ của vùng nhiệt đới. Khi thay đổi nhiệt độ từ 10 lên 35°C cho thấy, tỷ lệ sống sót của các mẫu cúc đồng tiền thay đổi từ 80 đến 100%. Ngoài ra, chiều cao cây, chiều dài rễ và màu sắc của lá cũng thay đổi theo nhiệt độ. Ở công thức 3, khi nhiệt độ tăng từ 20 lên 25°C cho tỷ lệ sống cao nhất (đạt xấp xỉ 100%) và kích thước thân, rễ,

Bảng 5. Ảnh hưởng của điều kiện rèn luyện, nhiệt độ đến khả năng sống của cây con.

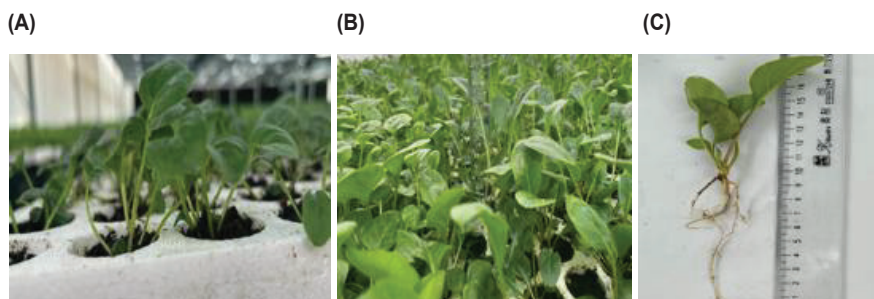
Công thức thí nghiệm	Nhiệt độ (°C)	Cúc đồng tiền cánh vàng cổ			Cúc đồng tiền cánh hồng cổ				
		Tỷ lệ sống sót (%)	Chiều cao cây trung bình sau 3 tuần (cm)	Chiều dài rễ trung bình sau 3 tuần (cm)	Màu sắc lá	Tỷ lệ sống sót (%)	Chiều cao cây trung bình sau 3 tuần (cm)	Chiều dài rễ trung bình sau 3 tuần (cm)	Màu sắc lá
Đôi chứng	0	10,05	3,2	1,7	Xanh	14,87	2,5	1,4	Xanh
CT1	10-15	80,06	4,4	2,2	Xanh	91,98	3	1,5	Xanh
CT2	15-20	95,83	5,3	2,5	Xanh đậm	95,97	5	2,5	Xanh đậm
CT3	20-25	98,84	5,8	3,5	Xanh đậm	99,21	5	4,5	Xanh đậm
CT4	25-30	90,07	4,6	3,3	Xanh đậm	92,17	4	2,3	Xanh đậm
CT5	30-35	85,45	4,1	3,1	Vàng nhạt	86,24	4	2,5	Vàng nhạt

lá cũng đạt kết quả tốt nhất đối với cả 2 giống cúc đồng tiền cổ. Cúc đồng tiền cánh vàng cổ có chiều cao trung bình sau 3 tuần cho ra rễ là 5,8 cm, chiều dài rễ là 3,5 cm, lá màu xanh đậm; cúc đồng tiền cánh hồng cổ có chiều cao trung bình sau 3 tuần là 5 cm, chiều dài rễ là 4,5 cm, lá màu xanh đậm (hình 9 và 10).

Từ kết quả thí nghiệm thu được có thể kết luận, nhiệt độ 20-25°C là thích hợp nhất để cho ra rễ 2 giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ và cánh hồng cổ.



Hình 9. Mẫu cúc đồng tiền cánh vàng cổ cho ra giá thể sau 3 tuần nuôi cấy. (A) Mẫu sau 1 tuần đưa ra giá thể; **(B)** Mẫu sau 4 tuần đưa ra giá thể; **(C)** Mẫu sau 5 tuần đưa ra giá thể.



Hình 10. Mẫu cúc đồng tiền cánh hồng cổ cho ra giá thể sau 3 tuần nuôi cấy. (A) Mẫu sau 1 tuần đưa ra giá thể; **(B)** Mẫu sau 4 tuần đưa ra giá thể; **(C)** Mẫu sau 5 tuần đưa ra giá thể.

3.2.2. Kết quả ảnh hưởng của thành phần giá thể đến khả năng sống và sinh trưởng của cây con

Đưa cây ra giá thể là giai đoạn cuối cùng của quá trình nhân giống, trong giai đoạn đưa cây từ môi trường nhân tạo sang môi trường tự nhiên việc lựa chọn giá thể thích hợp cho sinh trưởng phát triển của cây là rất quan trọng. Mỗi một giá thể có đặc tính khác nhau. Mỗi loài cây trồng khác nhau trong giai đoạn vườn ươm phụ có yêu cầu khác nhau đối với điều kiện ngoại cảnh. Nhìn chung, giá thể tốt là giá thể có khả năng giữ ẩm tốt, thoát nước tốt và có khả năng cung cấp dinh dưỡng cho cây con ở giai đoạn đầu tiếp cận với môi trường sống tự nhiên. Cúc đồng tiền sau nuôi cấy mô có yêu cầu rất chặt chẽ đối với điều kiện môi trường; độ ẩm phải lớn nhưng không bị úng; nhiệt độ môi trường không quá cao; giá thể sạch và có khả năng cung cấp dinh dưỡng cho giai đoạn cây con trong vườn ươm. Để xác định giá thể phù hợp, chúng tôi tiến hành thử nghiệm các loại giá thể với kết quả thu được ở bảng 6.

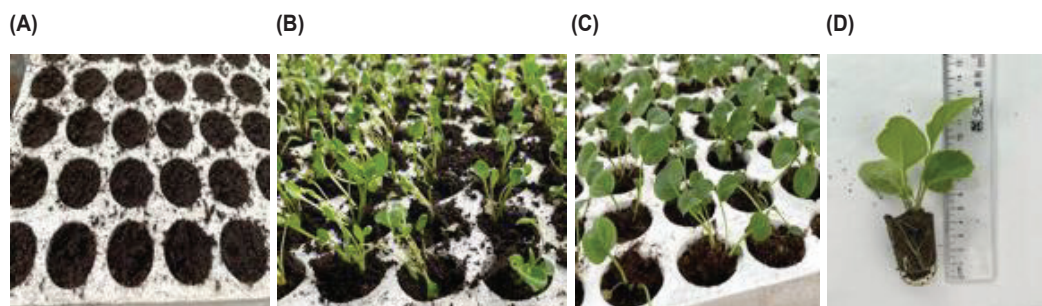
Kết quả bảng 6 cho thấy, giá thể cát (công thức 1) có khả năng thoát nước tốt, giữ nước kém không thích hợp với cúc đồng tiền con chiều dài rễ và số lá mang giá trị không cao, (tỷ lệ sống sau 30 ngày đạt thấp nhất 33,45% đối với giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ và 38,46% đối với giống cúc đồng tiền cánh hồng cổ). Giá thể 50% cát + 50% đất thịt (công thức 2) mặc dù trong những ngày đầu tiên cây phát triển tương đối tốt do cát có khả năng

Bảng 6. Ảnh hưởng của thành phần giá thể đến khả năng sống và phát triển của cây con.

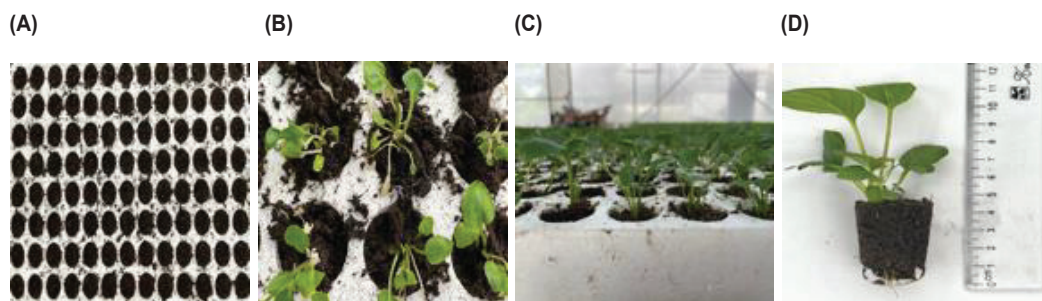
Công thức thí nghiệm	Giá thể	Cúc đồng tiền cánh vàng cổ			Cúc đồng tiền cánh hồng cổ		
		Tỷ lệ sống sót (%)	Chiều cao cây trung bình sau 4 tuần (cm)	Màu sắc lá	Tỷ lệ sống sót (%)	Chiều cao cây trung bình sau 4 tuần (cm)	Màu sắc lá
Đối chứng	0	0	0	-	0	0	-
CT1	100% cát	33,45	10,2	Xanh	38,46	11,6	Xanh
CT2	50% cát + 50% đất thịt	70,23	12,6	Xanh đậm	75,76	12,4	Xanh đậm
CT3	50% cát + 30% đất + 20% trấu hun	98,26	14,8	Xanh đậm	99,05	12,6	Xanh đậm
CT4	50% đất + 50% trấu hun	80,21	12,5	Xanh đậm	90,43	10,9	Xanh đậm
CT5	25% đất + 75% trấu hun	43,56	10,9	Vàng nhạt	45,24	9,7	Vàng nhạt

thoát nước tốt, song cũng giữ nước kém và dễ bị rửa trôi các chất dinh dưỡng nên cây con chết nhiều sau 30 ngày, đồng thời cây mảnh và yếu. Tỷ lệ sống chỉ đạt 70,23% đối với giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ và 75,76% đối với giống cúc đồng tiền cánh hồng cổ. Giá thể ở công thức 3 (50% cát + 30% đất + 20% trấu hun) và công thức 4 (50% đất + 50% trấu hun) có tỷ lệ sống cao, nhưng cao nhất là công thức 3. Cây xuất hiện lá mới và tăng trưởng về chiều cao tốt, cho tỷ lệ mẫu sống đạt 98,26% (cúc đồng tiền cánh vàng cổ) và 99,05%

(cúc đồng tiền cánh hồng cổ). Giá thể này cung cấp đầy đủ dinh dưỡng cho cây con, có khả năng giữ và thoát nước tốt, vì sau 30 ngày cây trồng trên giá thể này phát triển khỏe mạnh, cứng cáp. Chiều cao cây trung bình sau 4 tuần là 14,8 cm (cúc đồng tiền cánh vàng cổ) và 12,6 cm (cúc đồng tiền cánh hồng cổ), bản lá mở rộng, màu xanh thẫm. Công thức còn lại có tỷ lệ sống sót giảm, lá chuyển sang vàng nhạt do môi trường quá nhiều trấu hun không phù hợp với sự sinh trưởng của cây cúc đồng tiền (hình 11 và 12).



Hình 11. Cây cúc đồng tiền cánh vàng cổ cho ra giá thể sau 4 tuần nuôi cấy. (A) Giá thể ra rễ; (B) Mẫu bắt đầu cho ra giá thể; (C) Mẫu cho ra giá thể sau 2 tuần; (D) Mẫu cho ra giá thể sau 5 tuần (cả 2 giống cúc đồng tiền cổ).



Hình 12. Mẫu cúc đồng tiền cánh hồng cổ cho ra giá thể sau 4 tuần nuôi cấy. (A) Giá thể ra rễ; (B) Mẫu bắt đầu cho ra giá thể; (C) Mẫu cho ra giá thể sau 2 tuần; (D) Mẫu cho ra giá thể sau 5 tuần (cả 2 giống cúc đồng tiền cổ).

Như vậy, giá thể thích hợp nhất cho cây cúc đồng tiền trong giai đoạn vườn ươm là giá thể gồm 50% cát + 30% đất + 20% trấu hun.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường vào mẫu tối ưu là sử dụng dung dịch $\text{Ca}(\text{OCl}_2)_2$ 10% trong 7-8 phút và lắc trong dung dịch HgCl_2 0,1% trong 2-3 phút thu được tỷ lệ tạo mẫu sạch lên đến 90% (cúc đồng tiền cánh vàng cổ) và 92% (cúc đồng tiền cánh hồng cổ). Khả năng tái sinh chồi trực tiếp đạt kết quả tốt nhất khi bổ sung BAP và TDZ. Nồng độ chất điều

hoà sinh trưởng thích hợp nhất cho tái sinh chồi là 1,5 mg/l BAP và 2 mg/l TDZ đối với cả 2 giống cúc đồng tiền cổ nghiên cứu. Kết quả thu được là: tỷ lệ tái sinh đạt 52,17%, số chồi tái sinh là 5 chồi/mẫu đối với loại cúc đồng tiền cánh vàng cổ và tỷ lệ tái sinh là 53,85%, 6 chồi/mẫu đối với cúc đồng tiền cánh hồng cổ.

Các chất điều hoà sinh trưởng được bổ sung để nhân nhanh 2 giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ và cúc đồng tiền cánh hồng cổ đạt kết quả tốt nhất là IBA 1,5 mg/l kết hợp với BA 2 mg/l. Kết quả thu được: mẫu cúc đồng tiền cánh vàng cổ đạt tỷ lệ tạo chồi cao nhất sau 4 tuần là 44,45% với số lượng trung bình là 5 chồi/mẫu; giống cúc đồng tiền cánh hồng cổ tỷ lệ tạo chồi cao nhất đạt 46,15% với số lượng trung bình đạt 6 chồi/mẫu. Các chồi đều rất khoẻ mạnh và đều có thể sử dụng cắt nhân tiếp tục ra rễ.

Sử dụng NAA và IBA có thể kích thích ra rễ tốt nhất. Nồng độ chất điều hoà sinh trưởng thích hợp nhất cho việc ra rễ là 0,05 mg/l NAA và 0,3 mg/l IBA đối với cả 2 giống cúc đồng tiền cổ nghiên cứu. Kết quả thu được: số lượng rễ/chồi ở cúc đồng tiền cánh cổ vàng cổ là 6, chiều dài trung bình của các rễ sau 3 tuần là 2,5 cm, rễ có màu trắng; cúc đồng tiền cánh hồng cổ có số rễ/chồi là 7, chiều dài trung bình của rễ là 2,5 cm, màu trắng.

Nhiệt độ 20-25°C là thích hợp nhất để cho ra rễ 2 giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ và cánh hồng cổ. Ở nhiệt độ này 100% cây sống sót, kích thước thân, rễ, lá của 2 giống cúc đồng tiền cổ như sau: cúc đồng tiền cánh vàng cổ có chiều cao trung bình sau 3 tuần cho ra rễ là 5,8 cm, chiều dài rễ là 3,5 cm, lá màu xanh đậm; cúc đồng tiền cánh hồng cổ có chiều cao trung bình sau 3 tuần cho ra rễ là 5 cm, chiều dài rễ là 4,5 cm, lá màu xanh đậm.

Sau khi cây con đã được rửa sạch, đưa cây con ra ươm trồng trên vỉ xốp, vỉ nhựa... có chứa giá thể gồm 50% cát + 30% đất + 20% trấu hun. Tỷ lệ cây sống sau 8 tuần có thể đạt 98,26% đối với giống cúc đồng tiền cánh vàng cổ và 99,05% đối với giống cúc đồng tiền cánh hồng cổ. Cây phát triển khỏe mạnh, cứng cáp, chiều cao cây trung bình sau 4 tuần là 14,8 cm (đồng tiền cánh vàng cổ) và 12,6 cm (đồng tiền cánh hồng cổ), bản lá mở rộng, màu xanh thẫm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này có sử dụng hóa chất, máy móc, trang thiết bị, cây giống của Khoa Sinh, Kỹ thuật Nông nghiệp, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2 và Công ty TNHH Floris Việt Nam. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D.V. Dong, D.T. Loc (2003), *Gerbera Jamesonii Bolus*, Labour and Social Publisher Company Limited (in Vietnamese).
- [2] L.V. Hong, O.X. Phong, H.T. Quyen, et al. (2021), "Evaluation of the effects of magnetic field on the germination rates and early growth stage of the transvaal daisy *in vitro*", *Proceedings of 2021 Vietnam National Conference on Biotechnology*, pp.880-884.
- [3] D.T.T. Huong (2002), *Research on Breeding Gerbera Daisies Using In Vitro Culture Method*, Graduation internship report, Vietnam National University of Agriculture (in Vietnamese).
- [4] N.X. Linh (1998), *Flowers and Flower Growing Techniques*, Agricultural Publishing House, 140pp (in Vietnamese).
- [5] H.T.M. Ngan, T.D.H. Trinh, D.M. Cuong, et al. (2019), "Limitation of hyperdricity and enhanced survival rate of *Gerbera jamesonii* plantlets cultured *in vitro* on medium supplemented with silver nanoparticles", *Vietnam Journal of Biotechnology*, **17(1)**, pp.115-124 (in Vietnamese).
- [6] H.T. Tung, N.P. Huy, N.B. Nam, et al. (2016), "Effects of nano silver on growth of *Chrysanthemum morifolium* in microponic system", *Vietnam Journal of Biotechnology*, **14(3)**, pp.461-471 (in Vietnamese).
- [7] J.C. Cardoso, J.A.T.D. Silva (2013), "Gerbera micropropagation", *Biotechnology Advances*, **31(8)**, pp.1344-1357, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.05.008.
- [8] G. Minerva, S. Kumar (2013), "Micropropagation of *Gerbera jamesonii* Bolus", *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants*, DOI: 10.1007/978-1-62703-074-8_24.
- [9] K.A.A. Shabanpour, A. Sharifi, A. Bagheri, et al. (2011), "Effect of genotypes and culture medium on shoot regeneration and proliferation of *Gerbera jamesonii*", *Afr. J. Biotechnol.*, **10(57)**, pp.12211-12217.