

## ASSESS SEVERAL CONDITIONS TO ENHANCE THE *IN VITRO* PROPAGATION EFFICACY OF *Chrysanthemum indicum* L.

Nguyen Thi Thu Hien<sup>1,2,5</sup>, Nguyen Hong Nhung<sup>1</sup>, Dinh Thi Thao<sup>1</sup>,  
Chu Thi Thu Ha<sup>3</sup>, Vu Thi Nghiem<sup>4</sup>, Chu Hoang Ha<sup>1,2</sup>, Do Tien Phat<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biotechnology – VAST, <sup>2</sup>Graduate University of Science and Technology (GUST) - VAST

<sup>3</sup>Institute of Ecology and Biological Resources – VAST, <sup>4</sup>Institute of Materials Science – VAST, <sup>5</sup>Thuyloi University

| ARTICLE INFO                    | ABSTRACT  |
|---------------------------------|---|
| <b>Received:</b> 11/3/2025      | <i>Chrysanthemum indicum</i> L., belonging to the <i>Chrysanthemum</i> genus, is a medicinal plant widely cultivated for pharmaceutical applications. The common method for propagating this plant is through terminal stem cuttings, but it is insufficient to meet the current cultivation demand. In this study, we optimized conditions for enhancing the <i>in vitro</i> propagation efficacy of <i>C. indicum</i> in Vietnam. The results showed that using the white LED condition with a light intensity of 2000 lux was suitable for the shoot growth of <i>C. indicum</i> under the <i>in vitro</i> condition. The MS medium supplemented with 0.4 mg/L BAP and 0.1 mg/L Kinetin was sufficient for shoot multiplication of <i>C. indicum</i> . The highest shoot number/explant reached 9.51 on the 30th day on the shoot induction medium. Furthermore, the suitable medium for <i>in vitro</i> rooting of <i>C. indicum</i> was ½ MS salts with 30 g/L sucrose. The substrate combining vermiculite and perlite in a ratio of 1:1 was the most suitable for the <i>in vitro</i> plant accumulation, with a survival rate of 100%. This study provides potential results for further research to optimize and establish a sufficient procedure for <i>in vitro</i> propagation of <i>C. indicum</i> . |
| <b>Revised:</b> 13/8/2025       |   |
| <b>Published:</b> 13/8/2025     |   |
| <b>KEYWORDS</b>                 |   |
| <i>Chrysanthemum indicum</i> L. |   |
| <i>In vitro</i> propagation     |   |
| LED                             |   |
| Light intensity                 |   |
| Murashige and Skoog             |   |

## NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐIỀU KIỆN NUÔI CÂY NHẪM NÂNG CAO HIỆU QUẢ NHÂN NHANH *IN VITRO* CÂY CÚC HOA VÀNG (*Chrysanthemum indicum* L.)

Nguyễn Thị Thu Hiền<sup>1,2,5</sup>, Nguyễn Hồng Nhung<sup>1</sup>, Đinh Thị Thảo<sup>1</sup>,  
Chu Thị Thu Hà<sup>3</sup>, Vũ Thị Nghiê<sup>4</sup>, Chu Hoàng Hà<sup>1,2</sup>, Đỗ Tiến Phát<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, <sup>2</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, <sup>3</sup>Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, <sup>4</sup>Viện Khoa học vật liệu - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, <sup>5</sup>Trường Đại học Thủy lợi

| THÔNG TIN BÀI BÁO                 | TÓM TẮT  |
|-----------------------------------|--|
| <b>Ngày nhận bài:</b> 11/3/2025   | Cúc hoa vàng ( <i>Chrysanthemum indicum</i> L.) là một loài thực vật thuộc chi Cúc có tiềm năng khai thác trong công nghiệp dược phẩm. Giám hom thông qua thân ngầm đang được sử dụng phổ biến để nhân giống cúc hoa vàng, tuy nhiên phương pháp này chưa đáp ứng được nhu cầu về cây giống trong sản xuất hiện nay. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tối ưu một số điều kiện nhằm nâng cao hiệu quả nhân nhanh <i>in vitro</i> cây cúc hoa vàng tại Việt Nam. Kết quả nghiên cứu cho thấy, trong quá trình nhân nhanh <i>in vitro</i> , sử dụng ánh sáng LED trắng ở cường độ 2000 lux là thích hợp cho sinh trưởng của chồi cây cúc hoa vàng <i>in vitro</i> . Môi trường Murashige and Skoog bổ sung 0,4 mg/L 6-benzylaminopurine kết hợp 0,1 mg/L kinetin phù hợp cho giai đoạn nhân nhanh với hệ số nhân đạt 9,51 chồi/mẫu cây sau 30 ngày nuôi cấy. Thêm vào đó, môi trường ½ Murashige and Skoog với 30 g/L sucrose mang lại hiệu quả tạo rễ tốt nhất cho cây cúc hoa vàng <i>in vitro</i> . Giá thể kết hợp giữa vermiculite và perlite ở tỉ lệ 1:1 mang lại hiệu quả cao trong giai đoạn thích nghi và ra ngôi cây cúc hoa vàng nuôi cấy mô với tỉ lệ cây sống đạt 100%. Các kết quả này là cơ sở để hoàn thiện qui trình nhân giống <i>in vitro</i> cây cúc hoa vàng và tạo nguồn cây giống chất lượng phục vụ sản xuất. |
| <b>Ngày hoàn thiện:</b> 13/8/2025 |  |
| <b>Ngày đăng:</b> 13/8/2025       |  |
| <b>TỪ KHÓA</b>                    |  |
| <i>Chrysanthemum indicum</i> L.   |  |
| Nhân giống <i>in vitro</i>        |  |
| Ánh sáng LED                      |  |
| Cường độ chiếu sáng               |  |
| Môi trường Murashige and Skoog    |  |

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.12273>

\* Corresponding author. Email: [dtpat@ib.ac.vn](mailto:dtpat@ib.ac.vn)

## 1. Giới thiệu

Cây cúc hoa vàng (*Chrysanthemum indicum* L.) có nhiều tác dụng dược lý như: kháng khuẩn, chống oxy hoá... Loài cây này có tiềm năng để phát triển như nguồn thuốc từ thảo dược [1]. Hiện nay, cúc hoa vàng chủ yếu được nhân giống dựa vào các phương pháp truyền thống (giâm hom thông qua thân ngầm và đoạn cành) với hệ số nhân giống thấp, chất lượng cây giống không đồng đều, phụ thuộc nhiều vào thời vụ, đồng thời tiềm ẩn nguy cơ lây nhiễm nguồn bệnh và đặc biệt là hiện tượng thoái hóa giống. Điều này dẫn đến tăng chi phí và giảm hiệu quả sản xuất với người nông dân [2]. Kỹ thuật nuôi cấy mô thực vật được xem là giải pháp hiệu quả để khắc phục các hạn chế của phương pháp nhân giống truyền thống, đồng thời có thể tạo ra số lượng lớn cây giống với độ đồng đều cao từ một nguồn chọn lọc ban đầu. Ngoài ra, nhân giống cúc thông qua nuôi cấy mô còn giúp tạo ra nguồn cây giống sạch bệnh và giảm thiểu khả năng thoái hóa giống [3] - [5]. Do vậy, phương pháp này đã được ứng dụng rộng rãi và thành công trong việc tạo cây con trên các giống cúc phục vụ sản xuất ở quy mô công nghiệp tại nhiều quốc gia trên thế giới. Tuy nhiên, quá trình nhân giống *in vitro* loại cây này cũng gặp không ít trở ngại bởi phản ứng khác nhau giữa các giống, các nguyên liệu dùng trong nuôi cấy.

Gần đây, một số thành công trong nuôi cấy *in vitro* cúc hoa vàng đã được công bố trên thế giới. Cụ thể, Zafarullah và cộng sự [6] đã tiến hành đánh giá tác động của tổ hợp các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau tới các giai đoạn nuôi cấy *in vitro* cây cúc hoa vàng và đã lựa chọn được môi trường tối ưu cho cảm ứng tạo đa chồi và môi trường ra rễ. Alsoufi và cộng sự [1] đã sử dụng đốt thân có chứa mầm ngủ để xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cây cúc hoa vàng và đã lựa chọn được môi trường tạo đa chồi, môi trường ra rễ thích hợp. Ở Việt Nam, Phan Xuân Huyền và cộng sự [7] đã tiến hành thử nghiệm các chất điều hòa sinh trưởng trong việc nhân nhanh, tạo rễ và tạo cây cúc hoa vàng *in vitro*. Tuy nhiên, hệ số nhân giống cúc hoa vàng trong nghiên cứu này còn rất thấp, quy trình nhân giống cần tiếp tục nghiên cứu tối ưu và hoàn thiện để có thể áp dụng trong tạo nguồn giống nuôi cấy mô phục vụ sản xuất ở nước ta trong thời gian tới.

Các nghiên cứu trước đây cho thấy, ánh sáng là yếu tố có ảnh hưởng lớn tới hiệu quả nhân giống *in vitro* của nhiều đối tượng cây trồng, trong đó có cây thuộc chi cúc (*Chrysanthemum*) [8] - [10]. Mặc dù vậy, các nghiên cứu về cường độ chiếu sáng trên cây cúc hoa vàng vẫn chưa được tiếp cận và đánh giá. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiếp tục tối ưu một số điều kiện về ánh sáng cũng như các yếu tố môi trường nuôi cấy nhằm nâng cao hiệu quả nhân nhanh *in vitro* cây cúc hoa vàng tại Việt Nam. Thêm vào đó, các yếu tố liên quan tới khả năng ra rễ, chất lượng cây giống cũng như giá thể ra ngôi cũng được khảo sát và lựa chọn. Kết quả nghiên cứu này sẽ bổ sung thông tin giá trị cho việc hoàn thiện và ứng dụng quy trình nhân giống cây cúc hoa vàng thông qua nuôi cấy mô phục vụ các hướng nghiên cứu tiếp theo cũng như ứng dụng trong sản xuất loại cây dược liệu này ở nước ta.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cây cúc hoa vàng (*Chrysanthemum indicum* L.) sạch bệnh được lưu giữ *in vitro* tại phòng Công nghệ tế bào thực vật – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Môi trường Murashige and Skoog pH = 5,8 (MS) [11] và các chất điều hòa sinh trưởng được sử dụng trong chuẩn bị môi trường nuôi cấy trong nghiên cứu này để tối ưu các điều kiện nhân nhanh *in vitro* cây cúc hoa vàng.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Đánh giá ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng

Để đánh giá ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng đến sinh trưởng của các chồi cúc hoa vàng *in vitro*, hệ thống đèn LED trắng với các cường độ chiếu sáng khác nhau bao gồm 500 lux (CT1);

1000 lux (CT2); 2000 lux (CT3); 3000 lux (CT4) và 4000 lux (CT5) tương ứng với các mật độ chiếu sáng khác nhau (Bảng 1) được thiết lập tại phòng Công nghệ tế bào thực vật. Các đoạn mang hai đốt thân (1,5 cm) được cấy trên môi trường MS bổ sung 30 g/L sucrose và đặt dưới các cường độ chiếu sáng khác nhau ở nhiệt độ  $24 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1-2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , quang chu kỳ 16 giờ sáng/8 giờ tối. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm số đốt trung bình, chiều cao chồi và đường kính chồi sẽ được thu thập sau 2 tuần nuôi cấy.

### 2.2.2. Lựa chọn môi trường nhân nhanh chồi *in vitro*

Những đốt thân cây cúc hoa vàng *in vitro* được cấy trên môi trường MS [11], pH 5,8 có chứa 30 g/L sucrose, 8 g/L agar và bổ sung các tổ hợp 0 - 0,4 mg/L 6-benzylaminopurine (BAP) và 0 - 0,1 mg/L kinetin (Bảng 2). Mỗi công thức môi trường được thử nghiệm với 3 lần lặp trên 25-27 mẫu. Sau 30 ngày nuôi cấy, số lượng chồi/mẫu, hiệu suất chồi/mẫu được thu thập và đánh giá.

### 2.2.3. Xác định môi trường tạo rễ *in vitro*

Các chồi *in vitro* đồng đều về chiều cao 1,5 cm và có 1-2 cặp lá/chồi được cấy lên các môi trường ra rễ (Bảng 3). Mỗi công thức môi trường được thử nghiệm với 3 lần lặp trên 16 mẫu chồi ngọn *in vitro*. Sau 4 và 6 ngày nuôi cấy, khả năng tạo rễ của các chồi cúc hoa vàng *in vitro* trên các công thức môi trường khác nhau được xác định thông qua một số chỉ tiêu theo dõi gồm tỉ lệ chồi tạo rễ (%), số rễ/chồi, chiều dài rễ.

### 2.2.4. Lựa chọn giá thể ra cây cúc hoa vàng *in vitro*

Những cây cúc hoa vàng *in vitro* cao khoảng 3 cm và có rễ hoàn chỉnh được ra ngôi trên các hỗn hợp giá thể khác nhau (Bảng 4). Mỗi công thức môi trường được thử nghiệm với 3 lần lặp trên 25 mẫu. Các công thức thí nghiệm được đặt trong buồng sinh trưởng  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , chu kỳ chiếu sáng 16 giờ sáng/8 giờ tối và theo dõi sinh trưởng trong 40 ngày thông qua các chỉ tiêu tỉ lệ sống (%), số lá mới, chiều cao cây (cm), chiều dài bộ rễ (cm).

### 2.2.5. Bố trí thí nghiệm và phân tích kết quả

Điều kiện nuôi cấy *in vitro*: Các thí nghiệm trong nghiên cứu được đặt trong phòng nuôi cấy có cường độ chiếu sáng 2000 lux (ngoại trừ thí nghiệm về cường độ ánh sáng), thời gian chiếu sáng 16 giờ sáng/8 giờ tối ở nhiệt độ  $24 - 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  và độ ẩm không khí 75 - 85%.

Số liệu được thu thập và xử lý bằng chương trình Excel và phần mềm SPSS phiên bản 22.0. Ảnh hưởng của các nhân tố thí nghiệm được kiểm chứng bằng phân tích ANOVA một nhân tố, kiểm tra sự sai khác bằng Duncan's test,  $\text{LSD}_{0,05}$ , giá trị thể hiện trong bảng kết quả là giá trị trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn. Các chữ cái theo sau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với  $\alpha = 0,05$ .

## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng tới sinh trưởng cây cúc hoa vàng *in vitro*

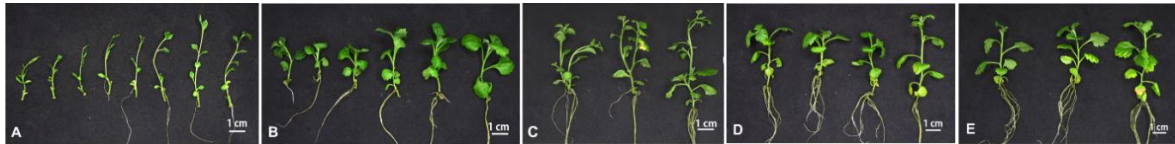
Trong nuôi cấy *in vitro*, ánh sáng được xem là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng trực tiếp đến hệ số nhân và chất lượng của cây con [8] - [10]. Trên cúc (*Chrysanthemum morifolium*), một số nghiên cứu đã chỉ ra ảnh hưởng của chất lượng ánh sáng đến quá trình nhân giống *in vitro* [12], [13]. Theo đó, nghiên cứu sử dụng đèn LED kết hợp xanh : đỏ : đỏ xa với cường độ chiếu sáng  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  là điều kiện thích hợp cho quá trình tái sinh chồi *Chrysanthemum morifolium* [13]. Nghiên cứu trên *Chrysanthemum*  $\times$  *grandiflorum* 'Polka' cũng chỉ ra ánh sáng đa phổ (fluorescent lamp) phù hợp cho sự phát triển của chồi *in vitro* [14]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng đèn LED trắng ở các cường độ chiếu sáng khác nhau để đánh giá sự ảnh hưởng của điều kiện thí nghiệm đến sinh trưởng và hình thái của chồi cúc hoa vàng *in vitro*. Sự thay đổi về hình thái chồi chỉ ghi nhận ở cường độ chiếu sáng thấp 500 lux (tương ứng mật độ chiếu sáng  $8,02 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) và không xảy ra ở các cường độ chiếu sáng trên 1000 lux (Hình 1). Số đốt và

chiều cao chồi thấp nhất ở cường độ chiếu sáng 1000 lux ( $16,04 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Khi tăng cường độ chiếu sáng, số đốt và chiều cao chồi tăng lên, tuy nhiên chúng tôi không ghi nhận sự khác biệt đáng kể giữa các công thức. Chiều cao lớn nhất của chồi cúc *in vitro* được ghi nhận ở cường độ 2000 lux ( $32,07 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) đạt đến 4,27 cm (Bảng 1). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Anželika và cộng sự trên cây cúc [13]. Ngoài ra, không có sự khác biệt về đường kính chồi giữa các cường độ chiếu sáng 1000-4000 lux. Do vậy, sử dụng đèn LED trắng với cường độ chiếu sáng 2000 lux (tương đương mật độ chiếu sáng  $32,07 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) là thích hợp cho sinh trưởng của chồi cúc hoa vàng *in vitro*. Đây cũng là nghiên cứu đầu tiên đánh giá ảnh hưởng của cường độ ánh sáng tới hiệu quả nhân giống *in vitro* của cây cúc hoa vàng.

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng đến sinh trưởng cây cúc hoa vàng *in vitro* sau 12 ngày nuôi cấy

| Công thức | Cường độ chiếu sáng (lux) | Mật độ chiếu sáng ( $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) | Số đốt trung bình (đốt/mẫu) | Chiều cao chồi (cm)  | Đường kính chồi (mm) |
|-----------|---------------------------|--|-----------------------------|----------------------|----------------------|
| CT1       | 500                       | 8,02   | $5,93 \pm 1,27^a$           | $3,68 \pm 0,89^b$    | $0,93 \pm 0,15^a$    |
| CT2       | 1000                      | 16,04  | $5,81 \pm 1,30^a$           | $2,58 \pm 0,67^a$    | $1,14 \pm 0,19^b$    |
| CT3       | 2000                      | 32,07  | $7,33 \pm 1,01^b$           | $4,27 \pm 2,00^b$    | $1,22 \pm 0,24^b$    |
| CT4       | 3000                      | 48,11  | $7,64 \pm 1,15^b$           | $3,37 \pm 1,09^{ab}$ | $1,25 \pm 0,18^b$    |
| CT5       | 4000                      | 64,15  | $7,25 \pm 0,62^b$           | $3,30 \pm 1,11^{ab}$ | $1,24 \pm 0,08^b$    |

Chú thích: Các chữ cái theo sau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với  $\alpha = 0,05$



**Hình 1.** Chồi cúc hoa vàng *in vitro* sinh trưởng dưới các cường độ chiếu sáng sau 12 ngày nuôi cấy

### 3.2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến hiệu quả nhân nhanh chồi cây cúc hoa vàng *in vitro*

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân đa chồi của Cúc hoa vàng *in vitro* sau 30 ngày nuôi cấy

| Công thức | Thành phần môi trường                | Số lượng chồi (chồi/mẫu) | Chiều cao chồi (cm) |
|-----------|--------------------------------------|--------------------------|---------------------|
| SM1       | MS                                   | $1,00 \pm 0,00^a$        | $3,22 \pm 0,25^c$   |
| SM2       | MS + 0,4 mg/L BAP                    | $5,36 \pm 1,06^b$        | $0,77 \pm 0,04^a$   |
| SM3       | MS + 0,2 mg/L BAP + 0,1 mg/L kinetin | $5,33 \pm 1,67^b$        | $0,71 \pm 0,10^a$   |
| SM4       | MS + 0,4 mg/L BAP + 0,1 mg/L kinetin | $9,51 \pm 1,32^c$        | $0,83 \pm 0,19^a$   |
| SM5       | MS + 0,2 mg/L BAP                    | $3,97 \pm 1,42^b$        | $2,19 \pm 0,52^b$   |

Chú thích: Các chữ cái theo sau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với  $\alpha = 0,05$

Đối với cây thuộc chi Cúc (*Chrysanthemum*), nhiều nghiên cứu chỉ ra vai trò thúc đẩy khả năng nhân chồi *in vitro* của BAP khi được sử dụng đơn lẻ trong môi trường hoặc cùng với sự có mặt ở nồng độ thấp của kinetin hoặc 1-naphthaleneacetic acid (NAA) [6], [7], [15]. Tăng nồng độ BAP trong môi trường làm tăng số lượng chồi, tuy nhiên sử dụng nồng độ BAP cao trên 0,5 mg/L gây ảnh hưởng đến chất lượng chồi [6], [15]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy sử dụng BAP ở nồng độ thấp đã tác động đến khả năng nhân nhanh chồi cúc hoa vàng *in vitro*. Cụ thể, ở công thức không sử dụng chất điều tiết sinh trưởng (SM1), hệ số nhân chồi là thấp nhất, chỉ đạt trung bình 1 chồi/mẫu cấy, chiều cao chồi đạt giá trị lớn nhất 3,22 cm (Bảng 2). Ngoài ra, toàn bộ các chồi cúc hoa vàng trên môi trường SM1 có hiện tượng phát sinh rễ rất nhanh (Hình 2). Việc phát sinh rễ cũng được ghi nhận đối với công thức SM5 có bổ sung nồng độ thấp BAP (0,2 mg/L). Hệ số nhân chồi cúc hoa vàng tăng nhanh và có biến động lớn ở các tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng được thử nghiệm (Bảng 2). Trong đó, số chồi trung bình đạt cao nhất (9,51 chồi/mẫu cấy) trên môi trường SM4 và thấp nhất (3,97 chồi/mẫu cấy) ở môi trường SM5. Trên công thức SM3, số lượng chồi đạt thấp hơn so với trên môi trường SM4, chỉ đạt 5,33 chồi. Kết quả này

tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Văn Việt và cộng sự trên *C. indicum* [15], trong đó, tổ hợp 0,3 mg/L BAP và 0,2 mg/L kinetin tạo ra chồi to, khỏe với số chồi đạt 3,38. Trên môi trường sử dụng đơn lẻ BAP, số chồi chỉ đạt 3,97 khi nồng độ BAP là 0,2 mg/L và tăng lên 5,36 chồi khi nồng độ BAP tăng lên 0,4 mg/L. Nghiên cứu của Zafarullah cũng chỉ ra kết quả tương tự khi sử dụng BAP ở nồng độ 0,5 mg/L [6]. Như vậy, sử dụng đồng thời BAP và kinetin là thích hợp để nhân nhanh chồi cúc hoa vàng *in vitro* có chất lượng tốt.



Hình 2. Các mẫu đa chồi cúc hoa vàng *in vitro* trên các điều kiện môi trường sau 30 ngày nuôi cấy

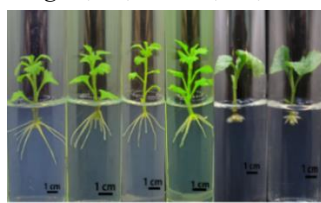
### 3.3. Ảnh hưởng của thành phần môi trường đến khả năng tạo cây cúc hoa vàng *in vitro* hoàn chỉnh

Một số nghiên cứu đối với nhân giống *in vitro* trên cúc đã chỉ ra rằng không có sự khác biệt về khả năng ra rễ của chồi cúc *in vitro* trên môi trường MS và ½ MS [1], [6], [16]. Đồng thời, trong điều kiện *in vitro*, đường sucrose là nguồn cung cấp carbon chủ yếu cho chồi *in vitro* sinh trưởng, và do đó thay đổi hàm lượng sucrose trong môi trường có thể ảnh hưởng đến khả năng ra rễ của chồi *in vitro* [17]-[19]. Kết quả thu được trong nghiên cứu này cho thấy, hàm lượng đường sucrose trong môi trường nuôi cấy ảnh hưởng tới tốc độ ra rễ của các chồi cúc hoa vàng *in vitro*, trong khi không tác động đến số lượng rễ và chiều dài rễ (Bảng 3). Cụ thể sau 4 ngày trên môi trường tại rễ, công thức R4 có tỉ lệ chồi ra rễ cao nhất đạt 53,47%. Tỉ lệ ra rễ ở các công thức khác sử dụng ½ MS (R2 và R3) và công thức sử dụng MS (R1) không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê. Sau 6 ngày thí nghiệm, chồi nuôi cấy trên tất cả các công thức thí nghiệm đều cho tỉ lệ ra rễ đạt 100%, tỉ lệ số lượng rễ và chiều dài rễ cũng không có sự thay đổi nhiều giữa 3 công thức này. Sự tăng khả năng ra rễ ở các công thức có hàm lượng đường cao hơn có thể do tỷ lệ giữa carbohydrate và nitrogen trong môi trường tăng lên [20].

Bảng 3. Ảnh hưởng của thành phần môi trường đến khả năng ra rễ của *C. indicum in vitro* sau 6 ngày nuôi cấy

| Công thức | Thành phần môi trường                                  | Tỉ lệ ra rễ sau 4 ngày (%) | Tỉ lệ ra rễ sau 6 ngày (%) | Số lượng rễ sau 6 ngày (rễ/mẫu cấy) | Chiều dài rễ sau 6 ngày (cm) |
|-----------|--|----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| R1        | MS + 20 g/L sucrose                                    | 11,80 ± 0,69 <sup>b</sup>  | 100 ± 0,00 <sup>a</sup>    | 6,33 ± 0,57 <sup>a</sup>            | 3,47 ± 0,25 <sup>b</sup>     |
| R2        | ½ MS + 20 g/L sucrose                                  | 17,36 ± 4,86 <sup>b</sup>  | 100 ± 0,00 <sup>a</sup>    | 6,20 ± 0,20 <sup>a</sup>            | 3,77 ± 0,15 <sup>b</sup>     |
| R3        | ½ MS + 15 g/L sucrose                                  | 11,80 ± 0,69 <sup>b</sup>  | 100 ± 0,00 <sup>a</sup>    | 6,46 ± 1,03 <sup>a</sup>            | 4,03 ± 0,25 <sup>b</sup>     |
| R4        | ½ MS + 30 g/L sucrose                                  | 53,47 ± 9,03 <sup>c</sup>  | 100 ± 0,00 <sup>a</sup>    | 6,67 ± 0,31 <sup>a</sup>            | 3,10 ± 1,31 <sup>b</sup>     |
| R5        | ½ MS + 20 g/L sucrose + 0,1 mg/L indole-3-butyric acid | 0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>   | 100 ± 0,00 <sup>a</sup>    | 12,77 ± 1,24 <sup>c</sup>           | 0,80 ± 0,13 <sup>a</sup>     |
| R6        | ½ MS + 20 g/L sucrose + 0,1 mg/L NAA                   | 0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>   | 100 ± 0,00 <sup>a</sup>    | 10,32 ± 0,92 <sup>b</sup>           | 1,13 ± 0,03 <sup>a</sup>     |

Chú thích: Các chữ cái theo sau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với  $\alpha = 0,05$



Hình 3. Khả năng phát sinh rễ của cúc hoa vàng *in vitro* trên các điều kiện môi trường sau 6 ngày nuôi cấy

Việc bổ sung chất điều tiết sinh trưởng nhóm auxin như indole-3-butyric acid (IBA), NAA vào môi trường nuôi cấy mô giúp tăng khả năng cảm ứng tạo rễ cũng như số lượng rễ của chồi *C. indicum* [1], [6]. Hàm lượng IBA bổ sung vào môi trường cảm ứng tạo rễ cho *C. indicum* là khác nhau giữa các nghiên cứu. Zafarullah và cộng sự đã chứng minh môi trường MS bổ sung IBA 0,1

mg/L phù hợp để tạo rễ cho chồi cúc *in vitro* [6]. Trong khi đó, Alsoofi và cộng sự [1] chỉ ra rằng môi trường  $\frac{1}{2}$  MS bổ sung IBA 1,0 mg/L đạt hiệu quả ra rễ cao nhất. Theo đó, trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành khảo sát kết quả tạo rễ *in vitro* cúc hoa vàng trên môi trường  $\frac{1}{2}$  MS bổ sung 0,1 mg/L IBA hoặc 0,1 mg/L NAA. Kết quả cho thấy bổ sung IBA hoặc NAA đều giúp tăng đáng kể số lượng rễ và đạt giá trị lớn nhất với 12,77 rễ/mẫu ở công thức R5 và 10,32 rễ/mẫu ở công thức R6. Tuy nhiên, việc bổ sung chất điều tiết sinh trưởng làm kéo dài thời gian ra rễ so với việc không bổ sung. Cụ thể là, sau 4 ngày nuôi cấy thì chồi sinh trưởng trên môi trường R5 và R6 chưa xuất hiện rễ, trong khi chồi ở các công thức khác đã ra rễ (Bảng 3). Mặt khác, tại cùng một thời điểm quan sát (6 ngày), rễ cây cúc hoa vàng *in vitro* ở hai công thức R5, R6 đều ngắn hơn nhiều (dưới 1,2 cm) so với các công thức không bổ sung chất điều tiết sinh trưởng (Bảng 3 và Hình 3). Nghiên cứu của Zafarullah và Alsoofi đều chỉ ra thời gian tạo rễ cho chồi *C. indicum in vitro* là 4 - 8 tuần [1], [6]. Thêm vào đó, chúng tôi cũng ghi nhận không có sự khác biệt về tỉ lệ sống sau khi ra cây giữa các công thức ra rễ trong điều kiện giá thể tối ưu. Do đó, để đảm bảo hiệu quả kinh tế trong việc ứng dụng quy trình này vào sản xuất, điều kiện ra rễ phù hợp đối với các chồi cúc hoa vàng *in vitro* sau 6 ngày nuôi cấy là môi trường  $\frac{1}{2}$  MS bổ sung 30 g/L sucrose.

### 3.4. Ảnh hưởng của thành phần giá thể tới hiệu quả ra ngôi cây cúc hoa vàng *in vitro*

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của thành phần giá thể đến sinh trưởng, phát triển của *C. indicum* sau 40 ngày nuôi trồng

| Công thức | Thành phần giá thể                                     | Tỉ lệ sống (%) | Số lá mới (lá/cây)       | Chiều dài rễ (cm)         | Chiều cao cây (cm)        | Sinh khối tươi (g/cây)    |
|-----------|--|----------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| TN1       | Đất phù sa + trấu hun + phân bò ủ hoai mục tỉ lệ 3:2:1 | 80,0           | 4,76 ± 0,22 <sup>a</sup> | 14,85 ± 3,23 <sup>a</sup> | 7,06 ± 1,87 <sup>a</sup>  | 0,87 ± 0,08 <sup>a</sup>  |
| TN2       | Đất phù sa   | 44,0           | 7,33 ± 0,34 <sup>a</sup> | 17,56 ± 6,73 <sup>a</sup> | 10,34 ± 2,67 <sup>b</sup> | 1,43 ± 0,50 <sup>b</sup>  |
| TN3       | Vermiculite + perlite tỉ lệ 1:1                        | 100            | 4,78 ± 0,49 <sup>a</sup> | 22,42 ± 5,25 <sup>a</sup> | 5,62 ± 0,55 <sup>a</sup>  | 0,93 ± 0,16 <sup>ab</sup> |
| TN4       | Vermiculite + perlite + peatmoss tỉ lệ 1:1:3           | 100            | 6,59 ± 2,60 <sup>a</sup> | 15,90 ± 1,52 <sup>a</sup> | 6,33 ± 0,72 <sup>a</sup>  | 0,81 ± 0,04 <sup>a</sup>  |

Chú thích: Các chữ cái theo sau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với  $\alpha = 0,05$

Đất bazan, đất mùn, vụn xơ dừa, trấu hun, vermiculite, perlite là những giá thể được sử dụng phổ biến trong ra ngôi cây con ở giai đoạn vườn ươm [3], [4], [7], [21]. Ở Việt Nam, kết quả nghiên cứu về giá thể trồng cây với cúc hoa vàng còn hạn chế, trong đó có nhóm nghiên cứu của Phan Xuân Huyền và cộng sự đã lựa chọn vụn xơ dừa làm giá thể ra ngôi cây cúc hoa vàng nuôi cấy mô ra ngoài vườn ươm, với tỉ lệ sống cao [3]. Ở điều kiện trồng trọt khu vực Đồng bằng Bắc Bộ, chúng tôi tiếp tục thử nghiệm các giá thể ra cây khác bao gồm: đất phù sa phối trộn trấu hun và phân bò ủ hoai mục; đất phù sa không phối trộn; vermiculite phối trộn perlite; vermiculite phối trộn perlite và peatmoss. Kết quả cho thấy, tỉ lệ sống của cây *in vitro* trồng trên giá thể vermiculite + perlite (TN3) và giá thể vermiculite + perlite + peatmoss (TN4) đều đạt 100%, trong khi tỉ lệ này ở điều kiện đất phù sa + trấu hun + phân bò ủ hoai mục (TN1) và đất phù sa (TN2) chỉ đạt tương ứng là 80 và 44% (Bảng 4). Như vậy, hai loại giá thể TN3 và TN4 có khả năng tạo độ thông thoáng hơn so với các loại giá thể còn lại để bộ rễ cây cúc hoa vàng *in vitro* có thể thích nghi và phát triển khi ra ngôi, điều này cũng được ghi nhận trong nghiên cứu trước đây [4]. Trong đó, ở công thức giá thể phối trộn vermiculite + perlite, rễ cây con ra ngôi có khả năng kéo dài tốt hơn với chiều dài rễ là 22,42 cm. Tuy nhiên, đây là các giá thể trợ với hàm lượng dinh dưỡng rất thấp dẫn tới sinh trưởng của cây cúc hoa vàng ở giai đoạn sau sẽ chậm hơn so với giá thể nhiều dinh dưỡng (TN1 và TN2). Do vậy, để đảm bảo tỉ lệ sống cao khi ra cây cúc hoa vàng *in vitro*, chúng tôi khuyến cáo sử dụng giá thể TN3 kết hợp với việc bổ sung thêm dinh dưỡng dạng dung dịch khi cây con đã thích nghi và ra lá mới nhằm kích thích sinh trưởng của cây cúc hoa vàng *in vitro* tại vườn ươm.

#### 4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá và lựa chọn được một số điều kiện phù hợp trong quy trình nhân giống cúc hoa vàng *in vitro* phục vụ định hướng sản xuất. Trong đó, cường độ chiếu sáng LED phù hợp trong nhân giống cúc hoa vàng *in vitro* là 2000 lux (với mật độ quang  $32,07 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ); môi trường thích hợp để nhân nhanh cây giống cúc hoa *in vitro* là MS bổ sung 0,4 mg/L BAP và 0,1 mg/L kinetin, với hệ số nhân chồi đạt 9,51 chồi sau 30 ngày nuôi cấy; môi trường  $\frac{1}{2}$  MS bổ sung 30 g/L sucrose phù hợp để tạo cây con hoàn chỉnh; giá thể vermiculite kết hợp perlite đảm bảo khả năng thích nghi và sống sót cao khi ra ngôi cây cúc hoa vàng *in vitro* trong điều kiện vườn ươm.

#### Lời cảm ơn

Kính phí hỗ trợ cho nghiên cứu này từ đề tài “Nghiên cứu ứng dụng tiến bộ công nghệ nuôi cấy mô và chiếu sáng LED nhằm tăng cường sinh trưởng, phát triển và hàm lượng các hoạt chất sinh học của Cúc hoa vàng (*Chrysanthemum indicum* L.)”; Mã số đề tài: ĐL0000.06/24-26.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] S. M. Alsoufi, Z. S. Ahmed, and A. M. Salim, "The efficiency of interaction between cytokines and auxins in Micropropagation of *Chrysanthemum* plant (*Chrysanthemum indicum* L.)," In *Proc. The 2nd Virtual International Scientific Agricultural Conference*, In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, vol. 735, 2021, Art. no. 012048, doi: 10.1088/1755-1315/735/1/012048.
- [2] G. R. Rout and P. Das, "Recent trends in the biotechnology of *Chrysanthemum*: A critical review," *Scientia Horticulturae*, vol. 69, no. 55, pp. 239–257, 1997.
- [3] C. Catalano, F. Carimi, A. Motisi, L. Abbate, M. Sarno, and A. Carrubba, "Long-Term field evaluation of conventional vs. micropropagated plants of *Chrysanthemum cinerariifolium*," *Agronomy*, vol. 12, no. 11, 2022, doi: 10.3390/agronomy12112756.
- [4] R. K. Kumar, K. P. Singh, and D. V. S. Raju, "Effect of different strains of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on macro and micro nutrient uptake in Micropropagated *Chrysanthemum* Plantlets," *Vegetos*, vol. 28, no. 2, pp. 47–54, 2015.
- [5] N. Miler, J. Iwona, S. Jakubowski, and J. Winiecki, "Ovaries of *Chrysanthemum irradiated* with high-energy photons and high-energy electrons can regenerate plants with novel traits," *Agronomy*, vol. 11, no. 6, 2021, doi: 10.3390/agronomy11061111.
- [6] A. Zafarullah, S. Ilyas, S. Naz, F. Aslam, and F. Manzoor, "Effect of culture media and growth regulators on *In vitro* propagation of *Chrysanthemum Indicum* L.," *Pakistan Journal of Science*, vol. 65, no. 4, pp. 462-466, 2013.
- [7] X. H. Phan, N. T. V. Truong, T. P. H. Nguyen, T. T. H. Nguyen, and V. K. Dinh, "*In vitro* propagation and growth of ex vitro *chrysanthemum indicum* L. in Da Lat - Lam Dong," (in Vietnamese), *Vietnam Journal of Biotechnology*, vol. 19, no. 1, pp. 175-184, 2021.
- [8] K. S. Shin, N. M. Hosakatte, J. W. Heo, E. J. Hahn, and K. Y. Paek, "The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured doritaenopsis plants," *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. 30, no. 3, pp. 339-343, 2008.
- [9] T. G. Do, H. H. Chu, B. N. Pham, K. H. Nguyen, H. K. Phan, T. T. B. Ha, N. C. Nguyen, T. N. Luong, and T. T. B. Nguyen, "Effect of led light on *in vitro* growth and development of *Anoectochilus roxburghii*," (in Vietnamese), *Vietnam Journal of Biotechnology*, vol. 15, no. 1, pp. 97–104, 2017.
- [10] N. Ahmad, B. H. Abbasi, H. Fazal, M. A. Khan, and M. S. Afridi, "Effect of reverse photoperiod on *in vitro* regeneration and piperine production in *Piper nigrum* L.," *Comptes Rendus Biologies*, vol. 337, no. 1, pp. 19-28, 2014.
- [11] T. Murashige and F. Skoog, "A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures," *Physiol Plant*, vol. 15, pp. 473-497, 1962.
- [12] V. Cavallaro, A. Pellegrino, R. Muleo, and I. Forgiione, "Light and plant growth regulators on *in vitro* proliferation," *Plants (Basel)*, vol. 11, no. 7, 2022, Art. no. 844.
- [13] K. Anželika, M. C. Renata, D. Stasė, Z. Silva, K. Genadij, T. Gintautas, D. Pavelas, and Z. Artūras, "*In vitro* culture of *Chrysanthemum* plantlets using light-emitting diodes," *Central European Journal of Biology*, vol. 3, pp. 161–167, 2008.

- [14] N. Miler, D. Kulus, A. Woźny, D. Rymarz, M. Hajzer, K. Wierzbowski, R. Nelke, and L. Szeffs, "Application of wide-spectrum light-emitting diodes in micropropagation of popular ornamental plant species: a study on plant quality and cost reduction," *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, vol. 55, no. 1, pp. 99–108, 2019.
- [15] V. V. Nguyen, "Study on application of thin cell layer culture for in vitro propagation of *Chrysanthemum indicum* L.," (in Vietnamese), *Journal of Forestry Science and Technology*, vol. 5, pp. 37-42, 2017.
- [16] M. Liao, Y. Pu, X. Wu, C. Ma, W. Wang, and S. Dai, "Establishment of regeneration system of *Chrysanthemum indicum* in Pingtan with various ligulate floret form," *Chinese Bulletin of Botany*, vol. 58, no. 3, pp. 449-460, 2023.
- [17] X. T. Nguyen, S. T. Dinh, H. T. Phan, G. T. Dinh, H. T. Nguyen, and S. H. Vu, "Effect of different medium factors on in vitro shoot multiplication of *Polygonatum kingianum*," (in Vietnamese), *Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology*, vol. 7, no. 128, pp. 24-29, 2021.
- [18] S. T. Dinh, H. H. Bui, H. N. Nguyen, T. P. Ninh, N. K. Pham, T. T. T. Dang, T. L. H. Nguyen, and T. H. Nguyen, "Establishment of *in vitro* Propagation Protocol for Baikal Skullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi.)," (in Vietnamese), *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, vol. 19, no. 3, pp. 301-310, 2021.
- [19] N. P. Lam, B. V. Nguyen, and T. T. N. Do, "Effects of light intensity and sucrose concentration in agar gelled MS medium on shoot formation of seedless watermelon (*Citrullus vulgaris* Schard.) *in vitro*," (in Vietnamese), *CTU Journal of Science*, vol. 4, pp. 1-8, 2005.
- [20] H. T. Hartmann, D. E. Kester, F. T. Davies, and R. L. Geneve, *Plant Propagation Principles and Practices*, 7th ed., Perntice Hall. Inc., New Jersey, USA, 2002.
- [21] X. H. Phan, T. N. Huynh, and T. P. H. Nguyen, "Study on *In vitro* propagation of *Hibicus sagittifolius* Kurz through stem node culture," (in Vietnamese), *Vietnam Journal of Agriculture Sciences*, vol. 15, no. 5, pp. 664-672, 2017.