TRƯỜNG ĐẠI HỌC TRÀ VINH
HỘI ĐỒNG KHOA HỌC

ISO 9001: 2008

BÁO CÁO TỔNG KẾT
ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC CẤP TRƯỜNG

NGHIÊN CỨU QUI TRÌNH VI NHÂN GIỐNG VÀ TRỒNG THỬ NGHIỆM CÂY HOA CÚC LƯỚI (*Chrysanthemum* sp.) TẠI TRÀ VINH

Chủ nhiệm đề tài : ThS. NGUYỄN NGỌC TRAI
Chức vụ : Nghiên cứu viên
Đơn vị : Trung tâm Thí nghiệm

Trà Vinh, ngày tháng năm 2014

TRƯỜNG ĐẠI HỌC TRÀ VINH
HỘI ĐỒNG KHOA HỌC

ISO 9001: 2008

BÁO CÁO TỔNG KẾT
ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC CẤP TRƯỜNG

NGHIÊN CỨU QUI TRÌNH VI NHÂN GIỐNG VÀ TRỒNG THỬ NGHIỆM CÂY HOA CÚC LƯỚI (*Chrysanthemum* sp.) TẠI TRÀ VINH

Xác nhận của cơ quan chủ quản
(Ký, đóng dấu, ghi rõ họ tên)

Chủ nhiệm đề tài
(Ký, ghi rõ họ tên)

Nguyễn Ngọc Trai

Trà Vinh, ngày tháng năm 2014

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành đề tài này, tôi xin chân thành gởi lời cảm ơn đến:

Ban Giám Hiệu, Khoa Nông nghiệp - Thủy sản, Phòng Khoa học Công nghệ và Đào tạo sau Đại học, Phòng Kế hoạch - Tài vụ, Trường Đại học Trà Vinh đã tạo điều kiện thuận lợi nhất để tôi có điều kiện làm việc và nghiên cứu đề tài.

Các bạn đồng nghiệp tại Trung tâm Thí nghiệm, Khoa Nông nghiệp Thủy sản Trường Đại học Trà Vinh đã hỗ trợ tô hoàn thành đề tài này.

Quí Thầy cô Trường Đại học Cần Thơ đã giảng dạy và truyền đạt những kiến thức quý báo làm nền tảng để tôi có thể thực hiện đề tài.

Các em sinh viên tại Trung tâm Thực nghiệm Trồng Trọt - Khoa Nông nghiệp - Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh đã giúp đỡ tôi chăm sóc cây ngoài nhà lưới tại khu thực nghiệm.

Chân thành cảm ơn với tấm lòng trân trọng nhất!

Nguyễn Ngọc Trai

TÓM LƯỢC

Mục tiêu của đề tài nhằm xây dựng qui trình vi nhân giống và qui trình trồng cúc lưới ra hoa tại khu thực nghiệm trường Đại học Trà Vinh. Kết quả nghiên cứu cho thấy qui trình vi nhân giống cây hoa cúc lưới được tóm tắt như sau: đoạn thân cây hoa cúc lưới được khử trùng với NaClO 5% (v/v) thời gian khử trùng 30 phút sau đó cấy vào môi trường MS bổ sung 30 g/l saccharose để chồi ngủ phát triển; lá từ các chồi ngủ được lấy nuôi cấy bằng phương pháp lớp mỏng tế bào lá trên môi trường MS bổ sung: 30 g/l saccharose, 1,0 mg/l IAA và 2,0 mg/l BA để tái sinh thành chồi mới; các chồi ngọn mới được hình thành tiếp tục được nhân nhanh trên nền môi trường môi trường MS + 10% nước dừa + 0,5 mg/l NAA + 30g/l đường saccharose + 1,5 mg/l BA; cuối cùng các chồi ngọn được tạo cây hoàn chỉnh trên nền môi trường MS bổ sung 30g/l saccharose và 1 mg/l NAA; cây con được ra ngôi trên nền giá thể mụn dừa: cát (tỷ lệ 1:1) sau khi cây được mang từ phòng thí nghiệm ra nhà lưới 1 tuần.

Sau khi ra ngôi 2 tuần cây được trồng trên luống với khoảng cách 20x20 cm, tiến hành tưới phân sau 5 ngày trồng và định kỳ 7 ngày tưới phân ure + N-P-K (16-16-8) ngâm và pha loãng cho cúc đến khi cây ra hoa kích thước khoảng 1,5 cm, trồng cây hoa cúc lưới cấy mô vào vụ Đông Xuân cây ra hoa tự nhiên mà không cần xử lý. Tuy nhiên, Đối với cây cúc lưới để từ 7-9 bông/cây đường kính hoa đạt 6,3 cm, đối với cây chỉ để 1 bông/cây đường kính hoa trung bình đạt 8,9 cm tương đương với kích thước hoa trên các cây mẹ lúc đầu mua về từ Đà Lạt và hoa cúc lưới đang bán tại các cửa hàng hoa tươi tại Trà Vinh.

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN ..... **i**
TÓM LƯỢC ..... **ii**
MỤC LỤC ..... **iii**
DANH SÁCH BẢNG ..... **v**
DANH SÁCH HÌNH ..... **vi**
DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT ..... **vii**
MỞ ĐẦU **1**
1. Tính cấp thiết của đề tài *1*
2. Mục tiêu của đề tài *2*
3. Nội dung thực hiện *2*
4. Phương pháp nghiên cứu *2*
5. Phương pháp phân tích số liệu *3*
CHƯƠNG 1 LƯỢC KHẢO TÀI LIỆU **4**
1.1. Sơ lược về cây hoa cúc và tình hình trồng cây hoa cúc *4*
1.1.1. Tình hình trồng hoa cúc trên thế giới 4
1.1.2. Tình hình trồng hoa cúc ở Việt Nam 5
1.2. Đặc điểm sinh trưởng và kỹ thuật trồng cây hoa cúc *6*
1.2.1. Đặc điểm sinh trưởng 6
1.2.2. Kỹ thuật trồng cây hoa cúc *Chrysanthemum* sp. 7
1.3. Tình hình nghiên cứu trong nhân giống cây hoa cúc trong và ngoài nước *9*
1.3.1. Trong nước 9
1.3.2. Ngoài nước 11
CHƯƠNG 2 NỘI DUNG NGHIÊN CỨU **13**
2.1. Thí nghiệm 1. Khảo sát qui trình xử lý mẫu cấy cúc lưới với dung dịch *14*
2.1.1. Mục đích nghiên cứu 14
2.1.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 14
2.1.3. Kết quả nghiên cứu 15

2.2. Thí nghiệm 2. Khảo sát ảnh hưởng tổ hợp BA và IAA lên sự tái sinh chồi từ mẫu cấy lớp mỏng tế bào lá cúc *17*
2.2.1. Mục đích nghiên cứu 17
2.2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 17
2.2.3. Kết quả nghiên cứu 18
2.3. Thí nghiệm 3. Khảo sát môi trường nhân nhanh chồi hoa cúc trên môi trường có bổ sung BA *22*
2.3.1. Mục đích nghiên cứu 22
2.3.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 22
2.3.3. Kết quả nghiên cứu 22
2.4. Thí nghiệm 4. Khảo sát môi trường ra rễ của chồi cây cúc lưới cấy mô dưới tác động của NAA *24*
2.4.1. Mục đích nghiên cứu 24
2.4.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 24
2.4.3. Kết quả nghiên cứu 25
2.5. Thí nghiệm 5. Thuần dưỡng cây con *26*
2.5.1. Mục đích nghiên cứu 26
2.5.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 26
2.5.3. Kết quả nghiên cứu 27
2.6. Thí nghiệm 6. Trồng và xử lý ra hoa trên cây cúc lưới nuôi cấy mô *30*
2.6.1. Mục đích nghiên cứu 30
2.6.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 30
2.6.3. Kết quả nghiên cứu 31
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ ……...34
3.1. Kết luận *36*
3.2. Kiến nghị *36*
3.3. Hướng phát triển của đề tài *37*
TÀI LIỆU THAM KHẢO……..35
PHỤ LỤC…….....38

DANH SÁCH BẢNG

Trang

Bảng 1. Tỷ lệ mẫu vô trùng, mẫu sống tái sinh (chồi ngủ phát triển) sau 4 tuần vô mẫu 16
Bảng 2. Tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng IAA và BA ở các nghiệm thức 18
Bảng 3. Trạng thái mẫu lát mỏng tế bào lá cúc thời điểm 2, 4 và 6 tuần sau khi cấy 18
Bảng 4. Số chồi bất định tái sinh trực tiếp từ mẫu lát mỏng tế bào lá cúc sau 8 tuần nuôi cấy 20
Bảng 5. Sự hình thành rễ của chồi hoa cúc lưới sau 4 và 6 tuần nuôi cấy.....25
Bảng 6. Tỷ lệ sống của cây cúc lưới sau khi ra ngôi 4 tuần ngoài nhà lưới 27
Bảng 7. Một số đặc điểm sinh trưởng của cây hoa cúc lưới cấy mô được trồng thử nghiệm tại Trường Đại học Trà Vinh sau 60 ngày trồng 31

DANH SÁCH HÌNH

Trang

Hình 1. Tỷ lệ vô trùng mẫu tại thời điểm 1, 2, 3 và 4 tuần sau khi vô mẫu.....15
Hình 2. Trạng thái mẫu lát mỏng tế bào lá cúc sau khi cấy 4 tuần ở các nghiệm thức (NT) 1, 2, 3, 4 và 5 20
Hình 3. Trạng thái mẫu nuôi cấy lát mỏng tế bào lá cúc sau 8 tuần nuôi cấy ở các nghiệm thức (NT) 5; 6 và 7 21
Hình 5. Sự hình thành rễ của chồi cây hoa cúc lưới sau 4 tuần nuôi cấy ở các nghiệm thức 1, 2, 3, 4 và 5. 26
Hình 6. Cây cúc lưới nuôi cấy mô được thuần dưỡng sau 4 tuần trong nhà lưới 28
Hình 7. Qui trình vi nhân giống cây hoa cúc lưới tại Trường Đại học Trà Vinh 29
Hình 8. Đường kính hoa cúc lưới ở cây để nhiều bông (a) và cây để 1 bông (b).....32
Hình 9. Kiểu dáng hoa khi nở hoàn chỉnh (a); Chồi ngọn được trồng trong chậu nhỏ để bàn (b).....33
Hình 10. Hội thảo về cây hoa cúc lưới được tổ chức tại Trường Đại học Trà Vinh 35

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

BA/BAP:	N^6 - Benzyladenin/6-Benzylaminopurin
NAA:	1-Naphtalene acetic acid
IAA:	indol-3- acetic acid
TCL:	Thin Cell Layer
MS:	Murashige and Skoog
TSKC:	Tuần sau khi cấy
NCM:	Nuôi cấy mô
LSD:	Least Significant Difference
ANOVA:	Analysis variance
mg/l:	miligram/lít
g/l:	gram/lít

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Do có giá trị thẩm mỹ và giá trị kinh tế cao nên hoa Cúc đã trở thành loài hoa cắt cành và trồng chậu được ưa chuộng nhất hiện nay trên thế giới (Erler và Siegmum, 1986). Hoa Cúc được trồng ở nhiều nước trên thế giới như Nhật Bản, Trung Quốc, Đài Loan,… Ở Việt Nam, hoa Cúc được trồng khắp các tỉnh thành. Hiện nay, có rất nhiều công ty trong và ngoài nước đầu tư sản xuất hoa cắt cành phục vụ nhu cầu tiêu thụ nội địa và xuất khẩu, trong đó họ rất chú trọng đến hoa Cúc. Các giống hoa Cúc được trồng phổ biến như cúc vàng Hè, cúc mâm xôi, cúc Tiger, cúc vàng Đài Loan, cúc lưới... Trong số đó thì Hoa cúc lưới (loài hoa cúc với hoa được bao bởi lưới bao hoa) là loài cúc có kiểu dáng hoa đẹp, giá trị kinh tế cao nên đã được tập trung nghiên cứu nhân giống và trồng ở nhiều nơi; chủ yếu ở Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng. Loài hoa này đang rất được ưa chuộng trên thị trường. Hoa có mặt ở các cửa hàng hoa tươi và ở khắp các chợ với giá vào khoảng 3.000 đồng/cành.

Trà Vinh có làng hoa Long Đức nổi tiếng khắp các tỉnh thành trong cả nước. Làng hoa được hình thành bởi nhiều hộ nông dân trồng hoa lâu nay ở ấp Vĩnh Yên, xã Long Đức, Thành phố Trà Vinh. Đối với cây hoa Cúc, hiện nay bà con chỉ trồng phổ biến 2 giống: cúc vàng Đài Loan và cúc Tiger với nhu cầu giống khoảng 300.000 cây/năm chủ yếu để cung cấp cúc chậu (vào dịp tết) và cúc cắt cành cho khách hàng trong và ngoài tỉnh. Mặc dù nhu cầu nguồn giống lớn nhưng phần lớn người dân chủ yếu mua giống từ Đà Lạt (Lâm Đồng), Sa Đéc (Đồng Tháp) mà chưa sản xuất được tại chỗ. Do cách trở về địa lý nên nên việc kiểm tra chất lượng cây con còn hạn chế, chi phí vận chuyển cao, đặc biệt là tỷ lệ hao hụt cao, chất lượng cây giống giảm nên đã ảnh hưởng trực tiếp đến năng suất và chất lượng hoa sau này. Đối với giống hoa cúc lưới bà con nông dân tại làng hoa trước nay chưa từng trồng.

Do cúc lưới được trồng chủ yếu ở Đà Lạt nên việc vận chuyển một quãng đường xa đến nơi tiêu thụ như Trà Vinh sẽ làm giảm chất lượng của hoa và tăng giá thành sản phẩm, hạn chế sức mua của người tiêu dùng. Việc nhân giống và trồng thử nghiệm thành công giống hoa này tại địa phương sẽ mang lại nhiều lợi ích kinh tế và xã hội, góp phần mạnh mẽ vào sự phát triển làng hoa của địa phương. Vi nhân giống (nhân giống *in vitro* hay nuôi cấy mô) là phương pháp nhân giống hiện đại, trong thời gian ngắn có thể tạo ra số lượng lớn cây giống với độ đồng đều cao, sạch bệnh, khắc phục được những hạn chế của phương pháp nhân giống truyền thống. Chính vì những lý do đó mà đề tài **"Nghiên cứu qui trình vi nhân giống và trồng thử nghiệm cây hoa cúc lưới (*Chrysanthemum* sp.) tại Trà Vinh"** được thực hiện.

2. Mục tiêu của đề tài

- Xây dựng qui trình vi nhân giống hoa Cúc lưới.
- Xây dựng qui trình trồng Cúc lưới ra hoa tại khu thực nghiệm Trường Đại học Trà Vinh.

3. Nội dung thực hiện

- Thí nghiệm nghiên cứu điều kiện vô trùng mẫu cấy ban đầu.
- Thí nghiệm tái sinh chồi bằng phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào mẫu lá, khảo sát môi trường nhân nhanh và ra rễ chồi cây hoa cúc lưới nuôi cấy mô.
- Hoàn thành qui trình vi nhân giống.
- Thuần dưỡng cây con nuôi cấy mô.
- Trồng cây cúc cấy mô trong điều kiện khu thực nghiệm của Trường Đại học Trà Vinh.
- Đánh giá khả năng sinh trưởng và tỉ lệ ra hoa của cây cúc cấy mô trồng tại khu thực nghiệm và hoàn chỉnh quy trình trồng cúc lưới ra hoa.
- Hoàn thành qui trình trồng cúc lưới ra hoa.
- Tổ chức hội thảo báo cáo kết quả nghiên cứu.

4. Phương pháp nghiên cứu

- Phương tiện nghiên cứu

a. Vật liệu: nguồn hoa cúc lưới (*Chrysathemum* sp.) giống phục vụ cho thí nghiệm có nguồn gốc từ Đà Lạt.

b. Dụng cụ: một số dụng cụ và máy móc chuyên dùng trong nuôi cấy mô tế bào thực vật: keo cấy thuỷ tinh, kẹp cấy, dao mổ, đĩa petri, nồi hấp tuyệt trùng, máy cất nước, tủ cấy vô trùng, phòng nuôi cây,...

c. Hoá chất: Môi trường MS (Duchefa), IAA (Indole-3-acetic acid), BA (6-benzylaminopurine), NAA (1-Naphtalene acetic acid), cồn 96^0, Sodium hypoclorate (NaClO), agar, bột giặt, đường cát (saccharose),...

- Cách tiếp cận

Kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào (Thin Cell Layer: TCL) được phát triển cách đây 30 năm. Áp dụng kỹ thuật này trong nhân giống các loài hoa kiểng mang lại nhiều thành công hơn cho các nhà nhân giống. Đặc điểm của phương pháp này là mẫu cấy có kích thước nhỏ từ những cơ quan khác nhau như lá, thân, rễ, nụ hoa, lá mầm,... TCL còn cho phép phân tích những mẫu cấy tế bào đặc biệt, mô, có thể cắt lớp mỏng từ khối callus... Các kết quả nghiên cứu cho thấy, mẫu cấy TCL lá dễ dàng hình thành mô sẹo trên môi trường. Sự xuất hiện chồi ở phương pháp nuôi cấy lớp mỏng sớm hơn phương pháp chồi đơn, rút ngắn được thời, tăng số lần cấy chuyền và số lượng lớn cây con (Jaime, 2003).

- Phương pháp nghiên cứu

Môi trường nuôi cấy dùng trong các thí nghiệm là môi trường MS có bổ sung 30g/l saccharose. Tuỳ theo mục tiêu cụ thể của từng thí nghiệm được bổ sung thêm các chất kích thích tăng trưởng thực vật BA, NAA, IAA ở các nồng độ khác nhau. Tất cả các môi trường sau khi pha chế đều được khử trùng bằng nồi hấp tiệt trùng nhiệt ướt ở 121 ^oC trong thời gian 15 phút. Tất cả các mẫu cấy được nuôi dưỡng trong phòng sáng 2000 lux, duy trì ở 25^oC, chiếu sáng 16h/ngày.

5. Phương pháp phân tích số liệu

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel và Stagraphic plus (version 3.0).

CHƯƠNG 1
LƯỢC KHẢO TÀI LIỆU

1.1. Sơ lược về cây hoa cúc và tình hình trồng cây hoa cúc

Cây hoa cúc có tên khoa học là *Chrysanthemum*, được định nghĩa từ Chiysos (vàng) và themum (hoa) bởi Line 1973. Hoa cúc có nguồn gốc từ Trung Quốc, Nhật Bản và một số nước Châu Âu. Hoa cúc được trồng ở Trung Quốc cách đây 3000 năm có nguồn gốc từ một số loài hoang dại thuộc họ cúc (*Dendrathema*), trải qua quá trình lai tạo và chọn lọc mới thành những giống cúc ngày nay (Đào Thanh Vân và Đặng Thị Tố Nga, 2007).

Hoa Cúc thuộc giới thực vật, ngành Magnoliophyta, lớp Magnoliopsida, bộ Asterales (Cúc). Bộ cúc có một họ duy nhất là họ Asteraceae, bao gồm gần 1000 chi và 20.000 loài phân bố khắp mọi nơi trên đất, sống được ở nhiều điều kiện khí hậu và thổ nhưỡng khác nhau. Dạng sống chủ yếu là thân thảo, cây bụi.

Chi *Chrysanthemum* được trồng phổ biến như là một loài hoa trồng chậu hoặc cắt cành trên toàn thế giới, nó đa dạng về màu sắc hoa với hàng ngàn kiểu dáng khác nhau.

1.1.1. Tình hình trồng hoa cúc trên thế giới

Hiện nay, ngành sản xuất hoa cúc trên thế giới đang phát triển mạnh và mang tính thương mại cao. Sản xuất hoa đã mang lại lợi ích kinh tế lo lớn cho nền kinh tế các nước trồng hoa trên thế giới nhất là đối với các nước đang phát triển.

Trong các loài hoa thông dụng, cây hoa cúc thuộc loại cây hoa lâu đời, được ưa chuộng và trồng rộng rãi nhất trên thế giới. Cách đây hàng thế kỉ người dân Trung Quốc, Nhật Bản đã trồng những giống cúc trong vườn của họ. Ở Nhật Bản cúc được coi là Quốc hoa, thậm chí ở các nhà hàng người ta có thể trang trí một bữa ăn với toàn hoa cúc. Tiếp sau Nhật Bản những nước trồng nhiều hoa cúc là: Hà Lan, Columbia, Trung Quốc.

Hà Lan là một trong những nước lớn nhất thế giới về xuất khẩu hoa, cây cảnh nói chung và xuất khẩu cúc nói riêng. Diện tích trồng cúc của Hà Lan chiếm 30% tổng diện tích trồng hoa tươi. Năng suất hoa tươi từ năm 1990 - 1995 tăng trung

bình từ 10 - 15%/1ha. Hàng năm Hà Lan đã sản xuất hàng trăm triệu cành hoa cắt và hoa chậu phục vụ cho thị trường tiêu thụ rộng lớn gồm trên 80 nước trên thế giới. Năm 1998, Hà Lan sản xuất 866 triệu cành và năm 1999, sản xuất 1046 triệu cành hoa cúc. Một trong những nguyên nhân quan trọng góp phần tạo ra sự thành công của Hà Lan là sử dụng phương pháp nhân giống *in vitro* để sản xuất cây con. Sau Hà Lan là Columbia - năm 1990 thu được 150 triệu USD từ việc xuất khẩu hoa cúc, đến năm 1992 đã lên đến 200 triệu USD.

Nhật Bản có nhu cầu sử dụng hoa cúc rất lớn. Diện tích trồng hoa cúc chiếm 2/3 tổng diện tích trồng hoa. Năm 1991 diện tích trồng hoa cúc ở Nhật Bản và 614 ha ngoài trời và 1150 ha nhà kính. Tuy vậy hàng năm Nhật Bản vẫn phải nhập một lượng lớn hoa cúc từ Hà Lan và một số nước khác trên thế giới. Năm 1996 Nhật Bản đã chọn Việt Nam là một trong số những nước sẽ xuất khẩu hoa cúc cho Nhật Bản.

Một số nước khác như Thái Lan, cúc đã được trồng quanh năm với số lượng cành cắt hàng năm là 50.841.500 (Đào Thanh Vân và Đặng Thị Tố Nga, 2007).

1.1.2. Tình hình trồng hoa cúc ở Việt Nam

Hoa cúc được du nhập vào Việt Nam từ thế kỷ 15, đến đầu thế kỷ 19 đã hình thành một số vùng chuyên canh nhỏ cung cấp cho nhân dân. Nếu xét về cơ cấu chủng loại tất cả các loại hoa thì trước những năm 1997, diện tích hoa hồng nhiều nhất chiếm 31%, nhưng từ 1998 trở lại, đây diện tích hoa cúc đã vượt lên chiếm 42%, trong đó hoa hồng chỉ còn 29,4%. Hiện nay hoa cúc được trồng khắp nước ta, nó có mặt ở mọi nơi từ núi cao đến đồng bằng, từ nông thôn đến thành thị nhưng chủ yếu tập trung ở các vùng hoa truyền thống của thành phố, khu công nghiệp, khu du lịch, nghỉ mát như Ngọc Hà, Quảng An, Nhật Tân (Hà Nội), Đằng Hải, Đằng Lâm (Hải Phòng), Hoành Bồ, Hạ Long (Quảng Ninh), Triệu Sơn, thành phố Thanh Hoá (Thanh Hoá), Gò Vấp, Hoóc Môn (thành phố Hồ Chí Minh), thành phố Đà Lạt (Lâm Đồng) với tổng diện tích trồng hoa khoảng 2000 ha. Riêng Hà Nội và Đà Lạt là những nơi lý tưởng cho việc sinh trưởng và phát triển của hầu hết các giống cúc được nhập từ nước ngoài vào (Đặng Văn Đông và Đinh Thế Lộc, 2003). Theo số

liệu của Tổng cục Thống Kê năm 2003, cả nước có 9.430 ha hoa và cây cảnh các loại sản lượng 482,6 tỷ đồng, trong đó hoa cúc là 1.484 ha cho sản lượng 129,49 tỷ đồng và được phân bố nhiều tỉnh trong nước. Hiện nay ở Việt Nam đang có một số công ty nước ngoài vào thuê đất lập doanh nghiệp hoặc liên doanh hợp tác sản xuất hoa. Chỉ tính riêng tỉnh Lâm Đồng đã có 4 công ty của các nước như Nhật Bản, Thái Lan ở Bảo Lộc, Đài Loan ở Di Linh, Chánh Đài Lâm ở Đức Trọng và Hasfarm ở Đà Lạt, trong đó họ rất chú ý đến sản xuất cúc. Đây là tín hiệu đáng mừng cho sự phát triển ngành sản xuất hoa Việt Nam nói chung, song cũng đáng lo cho các nhà sản xuất hoa nội địa.

Ở các tỉnh phía Nam thì Đà Lạt là nơi có diện tích trồng cúc lớn nhất, Đà Lạt là nơi lý tưởng cho sinh trưởng và phát triển của các giống hoa cúc nên một số công ty nước ngoài đã lập công ty hoặc liên doanh sản xuất ở đây như Chánh Đài Lâm, Hasfam, chỉ riêng công ty Hasfam (100% vốn đầu tư nước ngoài) chuyên sản xuất hoa cúc cắt, đặc biệt là hoa cúc chùm đã cung cấp 60% sản lượng hoa cho thành phố Hồ Chí Minh và một số tỉnh phía Bắc.

Hiện nay trong sản xuất, cúc có thể trồng quanh năm thay vì trước đây cho trồng được vào vụ thu đông đã đáp ứng nhu cầu về hoa cúc của người tiêu dùng. Hoa cúc là loại hoa có giá thành thấp hơn các loại hoa khác (400 - 800 đồng/cành) nên ngoài các vùng đô thị thì ở những vùng nông thôn miền núi, hoa cúc được tiêu thụ với mức độ khá (chỉ đứng thứ hai sau hoa hồng) đặc biệt vào ngày lễ tết truyền thống và ngày rằm. Về thị trường tiêu thụ thì thành phố Hồ Chí Minh là thị trường tiêu thụ hoa cắt lớn nhất Việt Nam, nhu cầu tiêu dùng hàng ngày từ 40 - 50 ngàn cành/ngày,... tiếp đó là Hà Nội có nhu cầu tiêu thụ từ 25 - 30 ngàn cành/ngày. Trong số các loài hoa cắt tiêu dùng hàng ngày thì hoa cúc chiếm từ 25 - 30% về số lượng và từ 17 - 20% về giá trị (Hoàng Ngọc Thuận, 2003)

1.2. Đặc điểm sinh trưởng và kỹ thuật trồng cây hoa cúc

1.2.1. Đặc điểm sinh trưởng

- **Khí hậu:** nhiệt độ thích hợp cho cây sinh trưởng là 15-20^{0}C, cây chịu được nhiệt độ 10-35^{0}C. Ở cây hoa cúc, thời kỳ cây con cần nhiệt độ cao hơn các thời kỳ

khác. Đặc biệt thời kỳ ra hoa nếu đảm bảo nhiệt độ cần thiết của cúc thì hoa sẽ to và đẹp. Độ ẩm đất thích hợp là 60-70%, ẩm độ không khí 55-65%.

- **Ánh sáng:** Cúc là loại cây ngày ngắn, ưa nắng. Thời kỳ cây con cây cần ít ánh sáng, thời kỳ chuẩn bị phân cành cây cần nhiều ánh sáng để quang hợp. Thời gian chiếu sáng có ảnh hưởng lớn đến năng suất chất lượng hoa. Hầu hết các loại hoa cúc trong thời kỳ sinh trưởng cần ánh sáng ngày dài trên 13 giờ, nhưng giai đoạn ra hoa cây chỉ cần ánh sáng 10-11 giờ.

- **Đất đai và nước:** Cúc ít đòi hỏi về điều kiện đất đai, thích hợp với đất thoáng khí, có độ ẩm tốt, có nhiều chất hữu cơ và pH khoảng 6,0-6,5. Cúc có thể sống sót được vài ngày trong điều kiện khô hạn nhưng nếu kéo dài sẽ ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây, vì vậy tưới nước rất quan trọng đối với cúc.

- **Phân bón:** Cúc là cây đòi hỏi lượng phân bón khá lớn, vì vậy cần bón 2 lần phân NPK (10-10-10), mỗi lần 25 kg/100m^2 (Đào Thanh Vân và Đặng Thị Tố Nga, 2007).

1.2.2. Kỹ thuật trồng cây hoa cúc Chrysathemum sp.

Theo Viện nghiên cứu và phát triển hoa, cây cảnh thuộc Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam thì qui trình trồng cây hoa cúc *Chrysathemum* sp. (http://www.hoasenvietnam.org.vn) có thể tóm tắt như sau:

a. Thời vụ trồng:

Nhìn chung, ở Việt Nam có một số thời vụ chính để trồng cúc như sau:

- Vụ Xuân Hè: trồng tháng 3, 4 thu hoa vào tháng 6, 7: Trồng giống Vàng Hè, Trắng hè, Tím hè....

- Vụ Hè Thu: trồng tháng 5, 6 thu hoa vào tháng 9, 10: Trồng giống Vàng Hè, Vàng hoè, Tím hè...

- Vụ Thu Đông: trồng tháng 8, 9 thu hoa vào tháng 11,12: Trồng giống Tím sen, Vàng Đài Loan, Vàng hoè, Vàng nghệ, đỏ nhung, phalê, trắng huệ...

- Vụ Đông Xuân: Trồng tháng 10, 11 thu hoa vào tháng 1, 2: Trồng giống Vàng Đài Loan, Tím sen, Chi trắng, Muống hồng, Tia sao, Thọ đỏ...

b. Kỹ thuật trồng, chăm sóc:

- Luống trồng: rộng 1,1-1,2m, mặt luống rộng 80- 90 cm, cao 20 - 30 cm (tùy thời vụ). Có thể bón lót kết hợp với lên luống.

- Mật độ và khoảng cách:

+ Với giống 1 bông: 14 x 15cm hoặc 15 x 15cm, mật độ 40 - 45 cây/m^2 (tương đương 14.000 – 15.000 cây/sào Bắc Bộ).

+ Với giống nhiều bông: 16 x 18 cm hoặc 18 x 18 cm, mật độ từ 30 - 35 cây/m^2(tương đương 8.000-9.000 cây/sào Bắc Bộ).

- Tưới nước:

+ Tưới mặt: dùng vòi hoặc bình ô doa để tưới, chỉ tưới đủ ẩm, không nên tưới đẫm nước (dùng cho cây mới trồng).

+ Tưới rãnh: Cho nước ngập 2/3 rãnh, để 1-2 giờ sau đó rút nước đi (tưới khi trời khô hanh, cây trồng được 10-15 ngày).

- Bón phân:

+ Lượng phân bón cho 1 sào Bắc bộ:

Phân chuồng hoai mục: 1-2 tấn;

Phân lân: 50Kg supelân;

Phân kali: 20kg Kali sufat;

Phân đạm: 20kg urê;

+ Cách bón:

Bón lót toàn bộ phân chuồng và 30 kg phân lân.

Bón thúc: Lượng phân còn lại chia làm 4 đợt để bón, cứ 7-10 ngày bón một lần.

- Tỉa cành: đối với cúc 1 bông phải tỉa bỏ các cành nhánh phụ và nụ con, chỉ để 1 nụ to trên thân chính. Tỉa bỏ ngay khi nụ còn bé để không tiêu hao dinh dưỡng của nụ chính. Đối với cúc chùm, nên tỉa bớt các cành tăm, cành mọc gần sát gốc cây và ngắt bỏ nụ chính để các nụ bên phát triển đồng đều.

- Xử lý quang gián đoạn để ngăn cản hiện tượng nở hoa sớm: Khi trồng cúc vào vụ Đông Xuân: dùng bóng điện 75W để chiếu sáng thêm 2-3 giờ/ngày. Chiếu sáng liên tục từ khi trồng đến trước trổ bông khoảng 30 ngày.

- Làm giàn giữ cây:

Khi cây cúc đạt chiều cao từ 20 – 30 cm tiến hành cắm cọc, làm giàn giữ cho cây cúc mọc thẳng không bị đổ. Khi cây lớn dần thì lưới được nâng dần lên theo độ cao của cây.

c. Phòng trừ sâu bệnh:

- Các loại sâu hại chính là: rệp, sâu xanh, sâu khoang, sâu vẽ bùa... Khi bị sâu hại, dùng tay để bắt hoặc sử dụng thuốc Karate 2,5 EC, Supracide 40ND, Pegasus 500 SC, Supathion 40 EC... để phòng trừ.

- Các loại bệnh thường gặp là: đốm lá, phấn trắng, đốm nâu, gỉ sắt. Có thể phòng trừ bằng thuốc Topsin M-70 WP, Score 250ND, Anvil 5 SC, Roval WP...

d. Thu hoạch và bảo quản hoa:

- Trước khi thu hoạch 7 - 10 ngày, hoà loãng kali vào nước tưới cho cây, trước khi cắt hoa 1 - 2 ngày cần tưới đẫm nước.

- Lựa chọn những bông hoa nở khoảng 2/3 số cánh, hoặc nở gần hoàn toàn cánh vòng ngoài, dùng kéo cắt cành cắt cách mặt đất khoảng 10 cm, cắt vào lúc sáng sớm hoặc chiều mát, vào các ngày khô ráo.

- Hoa sau khi thu hoạch cần đưa vào nhà mát để xử lý sơ bộ, sau đó ngâm vào dung dịch STS (Silver thiosulphate) 0,1%, ngập sâu 8 - 10 cm chiều dài cành trong thời gian 10 phút.

1.3. Tình hình nghiên cứu trong nhân giống cây hoa cúc trong và ngoài nước

1.3.1. Trong nước

Các nhà khoa học đã xác định cần phải chú trọng công tác nhập nội, chọn tạo và nhân nhanh các giống hoa chất lượng cao, nhất là hoa cúc, hồng, lay ơn,... Tăng cường tiếp nhận, chuyển giao kỹ thuật công nghệ trong lĩnh vực trồng, chăm sóc, thu hoạch và tiêu thụ để nâng cao giá trị sản phẩm. Trong đó vấn đề giống và kỹ

thuật canh tác được quan tâm hàng đầu. Chính vì thế công tác nhân giống đã được các viện nghiên cứu, trung tâm và trường đại học quan tâm nghiên cứu.

Từ năm 2003 đến năm 2006, tác giả Đặng Phương Trâm đã thực hiện thành công đề tài nghiên cứu *"Ứng dụng công nghệ sinh học trong nhân giống và áp dụng công nghệ cao để sản xuất một số giống hoa nhập nội tại thành phố Cần Thơ"* trong đó có giống hoa cúc. Các giống hoa cúc nhân bằng phương pháp nuôi cấy mô được trồng thử nghiệm trên ruộng theo phương thức trồng hoa cắt cành đã cho hoa rất tốt và đạt giá trị hàng hóa trong vụ Đông Xuân. Hiệu quả kinh tế của hoa trồng từ giống cấy mô cũng cao hơn hoa trồng từ giống truyền thống.

Về môi trường nuôi cấy, Lâm Ngọc Phương và Phạm Lê Tuấn (2007) dùng các mẫu lá nguyên và cắt đôi của cây cúc để tạo chồi bất định trực tiếp trên môi trường nuôi cấy MS với sự kết hợp của BA và IAA. Sau 4 tuần nuôi cấy tỉ lệ tạo chồi cao nhất ở các môi trường có tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng cao IAA (2-4mg/l) + BA (1-2mg/l) là 52 – 64%, và số chồi cao nhất là 4,8 – 6,1 chồi. Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với các tổ hợp ở nồng độ thấp hơn. Đối với mẫu cấy nguyên lá tái sinh tốt hơn so với mẫu cấy nửa lá và khác biệt thống kê ở mức 1%. Văn Hoàng Long và cộng sự năm 2007 đã tiến hành nghiên cứu giá thể nylon trong ra rễ cây hoa cúc *in vitro* và hệ thống vi thủy canh để cải thiện chất lượng cây hoa cúc nuôi cấy mô và giảm giá thành sản phẩm. Các tác giả đã sử dụng môi trường MS bổ sung 1,0mg/l BA + 0,2mg/l NAA để làm môi trường nhân chồi và môi trường ra rễ bổ sung 0,4mg/l IBA. Thí nghiệm đồng thời cũng xác định được nồng độ đường thích hợp cho ra rễ cây hoa cúc (Dương Tấn Nhựt, 2007). Sử dụng tia gamma chiếu xạ ở các cường độ và thời gian khác nhau kết hợp với nuôi cấy *in vitro* để tạo đột biến trên giống hoa cúc được Viện Hạt nhân Đà Lạt thực hiện. Kết quả cho thấy, tùy theo các giống cúc tổng tần suất các loại biến dị có thể đạt đến 24%, các loại biến dị về màu sắc và hình dáng của hoa xuất hiện từ 0,9% - 14,7%. Các đột biến xuất hiện như tạo ra hoa nhiều cánh hơn, thay đổi màu từ tím nhung sang hồng phấn. Nhiều nghiên cứu *in vitro* khác trên hoa cúc đã được nghiên cứu như nghiên cứu môi trường nhân nhanh chồi cây hoa cúc "Farm Tím"

(*Chrysanthemum* sp.*)* bằng phương pháp nuôi cấy mô (Nguyễn Mộng Thúy, 2009), khảo sát môi trường tạo rễ và tiền thuần dưỡng cây hoa Cúc "Farm Tím" (*Chrysan themum* sp.) *in vitro* (Đỗ Bé Thảo, 2009).

Năm 2009, Trung tâm Ứng dụng tiến bộ Khoa học và Công nghệ tỉnh Bình Định kết thúc chủ trì thực hiện nhân giống cấy mô một số loại cúc: cúc vàng hè, pha lê, Fam, CN93,... đúng chuẩn giống gốc về nuôi cấy trong phòng thí nghiệm sau đó ra vườn ươm, chuyển giao cho người trồng qua các mô hình (H. L, 2009).

1.3.2. Ngoài nước

Để nhân nhanh cây hoa cúc trong nuôi cấy mô, việc sử dụng chất điều hòa sinh trưởng thực vật là cần thiết. Vì vậy, các nhà khoa học đã tập trung nghiên cứu tác động của từng chất điều hòa sinh trưởng hoặc tác động tổng hợp của nhiều chất lên sự tái sinh chồi, nhân chồi, tạo rễ cây hoa cúc trong nuôi cấy mô.

Do được ưa chuộng ở nhiều nước trên thế giới nên hoa cúc đã trở thành một trong những mục tiêu thương mại đầu tiên trong vi nhân giống, bằng cách sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mô để sản xuất với số lượng lớn (Levin et al. 1988). Battacharya et al. (1990) đã nhân nhanh với số lượng lớn cây cúc *Chrysanthemum morifolium* qua con đường mô sẹo từ mẫu cấy thân và lá.

Roest và Bokelmann (1973) đã nghiên cứu và kết luận rằng việc kết hợp BA và IAA rất thích hợp cho việc tái sinh chồi *Chrysanthemum cinerariaefolium* trong nuôi cấy *in vitro*. Tuy nhiên trên các loài cúc khác nhau thì sự đáp ứng với chất điều hòa sinh trưởng thực vật cũng khác nhau.

Lazar và Cachita (1983) trình bày báo cáo nghiên cứu cho thấy sự phát sinh chồi bất định đạt cao nhất khi môi trường nuôi cấy MS có bổ sung 0,1 mg/l IAA + 10 mg/l BA.

Năm 1994, Khan và cộng sự nghiên cứu việc nhân nhanh chồi cúc *Chrysanthemum morifolium* Ramat, kết quả cho thấy hệ số nhân chồi đạt cao trên môi trường bổ sung 0,5 và 1,0 mg/l BA. Khi bổ sung 2,0 mg/l BA hệ số nhân chồi có tăng nhưng sự phát triển của chồi bị kìm hãm (chiều cao chồi thấp hơn ở nghiệm thức bổ sung 0,5 và 1,0 mg/l BA).

Nghiên cứu của Gul năm 2001 khi nuôi cấy mô các đoạn thân cây hoa cúc cũng chỉ ra rằng số chồi mới hình thành đạt cao nhất khi môi trường MS được bổ sung 0,5 mg/l BA. Việc gia tăng nồng độ BA bổ sung vào môi trường nuôi cấy có làm tăng hệ số nhân chồi, tuy nhiên sự tăng trưởng của chồi bị kìm hãm (Singh và Arora, 1995)

Năm 2002, Karim và cộng sự thuộc Bộ môn Thực vật, Trường Đại học Rajshahi, Bangladesh đã nghiên cứu nhân nhanh giống hoa cúc *Chrysanthemum morifolium* bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. Ông đã sử dụng IBA và Kinetin để kích thích tái sinh chồi từ mẫu cấy đốt thân và đỉnh sinh trưởng. Kết quả cho thấy sự tái sinh phản ứng tốt trên môi trường MS có bổ sung 1mg/l BA (lần lượt là 95% và 91% đối với đốt thân và đỉnh sinh trưởng). Callus hình thành trên môi trường 1/2MS với sự tác động kết hợp của 0,5 mg/l BA + 0,1 mg/l NAA. Phôi vô tính hình thành trên môi trường chỉ có BA và phát triển giống như cây con nhân giống thông thường (Ihsan Ilahi và cs, 2007). Số chồi trung bình thu được từ mẫu cấy đỉnh sinh trưởng trên môi trường MS có chứa IAA (0,1 mg/l) là 3,9 chồi; 1,0 mg/l IBA là 4,1 chồi; tương tự như vậy thì sự kết hợp giữa nồng độ BAP (1,0 - 2,0 mg/l) với IAA (0,1 – 0,2 mg/l) cho kết quả tốt hơn (6,9 – 7,0 chồi) so với các tổ hợp nồng độ khác.

Shatnawi et al. (2010) đã nghiên cứu nhân nhanh chồi và tạo rễ đối với các chồi ngọn của *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Sau 6 tuần nuôi cấy, kết quả nghiên cứu cho thấy rằng, môi trường MS bổ sung BA với nồng độ 0,3 mg/l phù hợp cho việc nhân nhanh chồi với số chồi mới hình thành là 4,35 chồi/mẫu cấy, ở các nghiệm thức có nồng độ BA thấp hoặc cao hơn cho hệ số nhân chồi thấp, bên cạnh đó khi nồng độ BA bổ sung càng cao sẽ làm ức chế sự phát triển của chồi (chiều dài chồi càng thấp). So với Kinetin thì việc bổ sung BA cho thấy có hiệu quả hơn trong việc nhân nhanh chồi (cho số chồi/mẫu cấy nhiều hơn). Đối với thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của các loại auxin lên quá trình tạo rễ từ các chồi ngọn cây cúc, kết quả nghiên cứu của ông cũng cho thấy rằng IBA, IAA, NAA bổ sung với nồng độ 0,2 mg/l cho hiệu quả tạo rễ cao nhất đạt 18,75; 10,68 và 14,82

rễ/chồi lần lượt đối với IBA, IAA và NAA. Khi bổ sung với nồng độ cao hơn sẽ ức chế sự hình hành rễ cũng như chiều dài rễ.

CHƯƠNG 2
NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

2.1. Thí nghiệm 1. Khảo sát qui trình xử lý mẫu cấy cúc lưới với dung dịch NaClO

2.1.1. Mục đích nghiên cứu

Nhằm tìm ra nồng độ Sodium hypochlorate (NaClO) và thời gian khử trùng thích hợp nhất cho việc khử trùng mẫu cấy các đoạn thân cây hoa cúc lưới.

2.1.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

a. Đối tượng nghiên cứu

- Cây Cúc lưới có rễ, hoa mua từ Đà Lạt. Sau đó cây được cắt bỏ hoa và được trồng lại tại nhà lưới thuộc khu thực nghiệm Trường Đại học Trà Vinh. Khi cây tạo các nhánh mới, các nhánh này được sử dụng để vô mẫu cho qui trình vi nhân giống.
- NaClO với các nồng độ và thời gian khử trùng khác nhau.

b. Phương pháp nghiên cứu:

Các đoạn thân trên cây hoa cúc có mang chồi ngủ được cắt và tiến hành rửa 5 phút dưới vòi nước chảy, sau đó rửa lại với dung dịch nước bột giặt rồi xả lại bằng nước vòi cho sạch bột giặt (3-5 lần). Mẫu cấy được khử trùng bằng dung dịch NaClO trong tủ cấy vô trùng với thời gian và nồng độ được bố trí theo các nghiệm thức như sau:

Nghiệm thức 1: NaClO 10% (v/v) trong thời gian 20 phút.

Nghiệm thức 2: NaClO 10% (v/v) trong thời gian 30 phút.

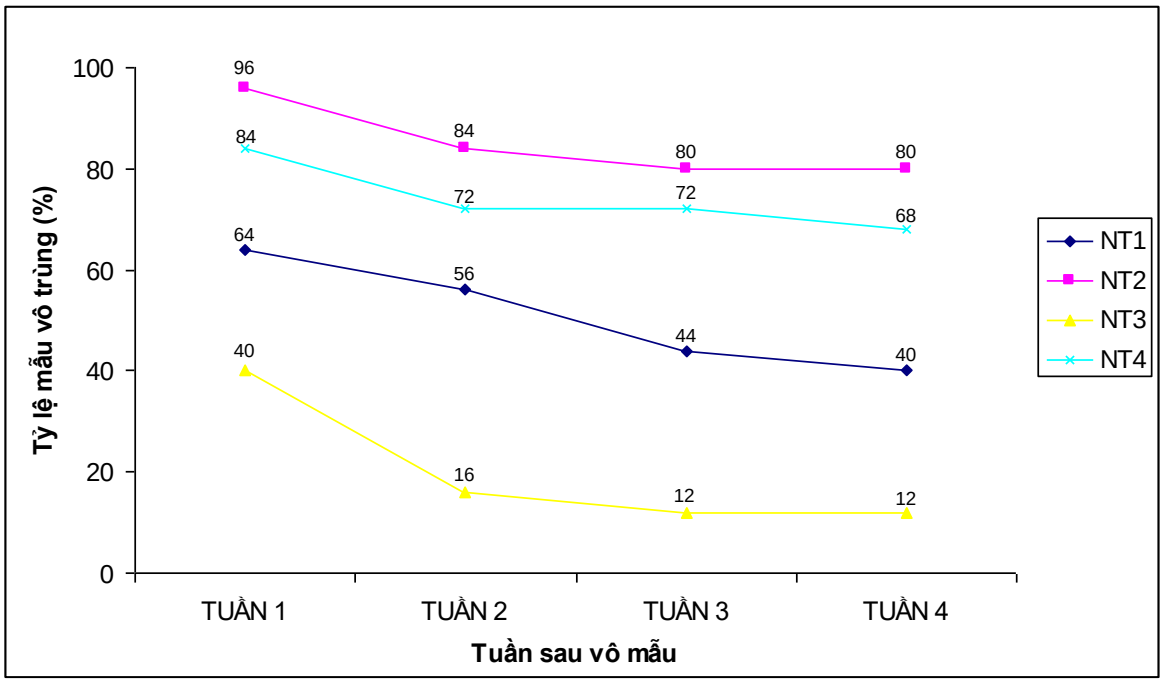
Nghiệm thức 3: NaClO 5% (v/v) trong thời gian 20 phút.

Nghiệm thức 4: NaClO 5% (v/v) trong thời gian 30 phút.

Mẫu sau khử trùng được cấy vào môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962) có bổ sung 2 mg/l BA, saccharose 30g/l. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 5 lần, mỗi lần là một keo có chứa 5 mẫu cấy/keo.

Chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ mẫu vô trùng (số mẫu không bị nhiễm/số mẫu ban đầu), tỷ lệ mẫu sống và tái sinh (mẫu vẫn còn xanh, có chồi ngủ phát triển/số mẫu ban đầu) sau 1, 2, 3 và 4 tuần vô mẫu.

2.1.3. Kết quả nghiên cứu



Ghi chú: NT: nghiệm thức

Hình 1. Tỷ lệ vô trùng mẫu tại thời điểm 1, 2, 3 và 4 tuần sau khi vô mẫu

Kết quả thí nghiệm trình bày ở hình 1 cho thấy sau khi vô mẫu 1 tuần ở tất cả các nghiệm thức đều có mẫu bị nhiễm nhưng với mức độ khác nhau, nghiệm thức 2 có tỷ lệ mẫu vô trùng cao nhất đạt 96%; nghiệm thức 3 có tỷ lệ mẫu vô trùng thấp nhất chỉ 40%. Khi mẫu để càng lâu thì tỷ lệ vô trùng càng giảm, hay nói cách khác khi để thời gian càng lâu thì tỷ lệ mẫu biểu hiện nhiễm càng tăng. Trong nuôi cấy mô, có một số loại nấm nếu chúng ta khử trùng mẫu chưa sạch sau thời gian nuôi cấy khoảng 3 ngày chúng đã phát triển thành khuẩn lạc và chúng ta đã nhìn thấy được; nhưng cũng có một số loài nấm chúng sẽ phát triển thành khuẩn lạc có thể sau 2, 3 hoặc 4 tuần vô mẫu.

Tuy nhiên, qua kết quả thí nghiệm được trình bày ở hình trên cho thấy rằng, tại thời điểm 3 và 4 tuần sau vô mẫu, tỷ lệ vô trùng tại 2 thời điểm này không chênh

lệch nhau nhiều ở nghiệm thức 1 và nghiệm thức 4; đối với nghiệm thức 2 và nghiệm thức 3 thì tỷ lệ vô trùng tại 2 thời điểm này không thay đổi. Sau 4 tuần vô mẫu ở nghiệm thức 2 có tỷ lệ mẫu vô trùng cao nhất đạt 80%; kế đến là nghiệm thức 4 và nghiệm thức 1 cho tỷ lệ vô trùng mẫu lần lượt là 68% và 40%; nghiệm thức 3 có tỷ lệ mẫu vô trùng thấp nhất chỉ 12%.

Bảng 1. Tỷ lệ mẫu vô trùng, mẫu sống tái sinh (chồi ngủ phát triển) sau 4 tuần vô mẫu

Nghiệm thức	Sau khi vô mẫu 4 tuần	
	Tỷ lệ mẫu vô trùng (%)	Tỷ lệ mẫu sống và tái sinh (%)
1	40 b	36 b
2	80 a	24 bc
3	12 c	12 c
4	68 a	64 a

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số có ít nhất 1 chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% qua phép thử LSD.

Qua kết quả thí nghiệm (bảng 1) cho thấy giữa nghiệm thức 2 và nghiệm thức 4 tỷ lệ vô trùng của mẫu sau 4 tuần vô mẫu không khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5% mặc dù nghiệm thức 2 cho tỷ lệ vô trùng mẫu cao hơn nghiệm thức 4 khoảng 12%. Tuy nhiên, khi xét về tỷ lệ mẫu sống và tái sinh,nghiệm thức 4 cho kết quả cao nhất đạt 64% và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các nghiệm thức còn lại. Mặc dù nghiệm thức 2 cho tỷ lệ mẫu vô trùng cao nhưng có thể do thời gian khử trùng lâu và nồng độ chất khử trùng cao nên các mẫu mặc dù không nhiễm nhưng bị chết nên cho tỷ lệ mẫu tái sinh thấp chỉ đạt 24%.

Từ kết quả thí nghiệm trình bày ở hình 1 và bảng 1 có thể kết luận rằng nghiệm thức 4 với nồng độ NaClO 5% (v/v), thời gian khử trùng 30 phút là phù hợp cho việc khử trùng các đoạn thân cây hoa cúc lưới bởi ở nồng độ và thời gian này cho tỷ lệ mẫu vô trùng và mẫu sống tái sinh cao.

2.2. Thí nghiệm 2. Khảo sát ảnh hưởng tổ hợp BA và IAA lên sự tái sinh chồi từ mẫu cấy lớp mỏng tế bào lá cúc

2.2.1. Mục đích nghiên cứu

Nhằm tìm ra tổ hợp nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thực vật BA (N^6-Benzyladenin) và IAA (Indole - 3 - acetic acid) thích hợp trong việc tái sinh chồi cây hoa cúc lưới từ mẫu cấy lớp mỏng tế bào lá.

2.2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

a. Đối tượng nghiên cứu

- Lá cây cúc lưới *in vitro*.

- Môi trường MS được bổ sung tổ hợp 2 chất điều hòa sinh trưởng thực vật BA và IAA với các nồng độ khác nhau.

b. Phương pháp nghiên cứu

Chồi con từ thí nghiệm 1 sau khi hình thành được cấy chuyền vào môi trường MS có bổ sung 2 mg/l BA, đường saccharose 30g/l để chồi tăng trưởng. Khi chồi cấy đạt khoảng 6 lá to, tiến hành lấy mẫu từ cặp lá thứ 2 tính từ ngọn xuống. Dùng lưỡi dao sắc cắt lá cúc theo chiều vuông gốc với gân chính, mỗi phần có chiều ngang khoảng 0,3-0,5 mm. Mẫu cấy được đặt vào môi trường theo hướng mặt dưới của lá tiếp xúc với môi trường. Thí nghiệm gồm 16 nghiệm thức (bảng 2) với 5 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 1 keo chứa 5 mẫu cấy lát mỏng tế bào lá cúc.

Chỉ tiêu theo dõi: trạng thái mẫu, số chồi/mẫu cấy, trọng lượng tươi cụm chồi sau thời gian nuôi cấy 2, 4, 6 và 8 tuần.

Bảng 2. Tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng IAA và BA ở các nghiệm thức

Nghiệm thức	Nồng độ chất KTST (mg/l)	
	IAA	BA
1	0,0	0,0
2	0,0	1,0
3	0,0	2,0
4	0,0	3,0
5	1,0	0,0
6	1,0	1,0
7	1,0	2,0
8	1,0	3,0
9	2,0	0,0
10	2,0	1,0
11	2,0	2,0
12	2,0	3,0
13	3,0	0,0
14	3,0	1,0
15	3,0	2,0
16	3,0	3,0

2.2.3. Kết quả nghiên cứu

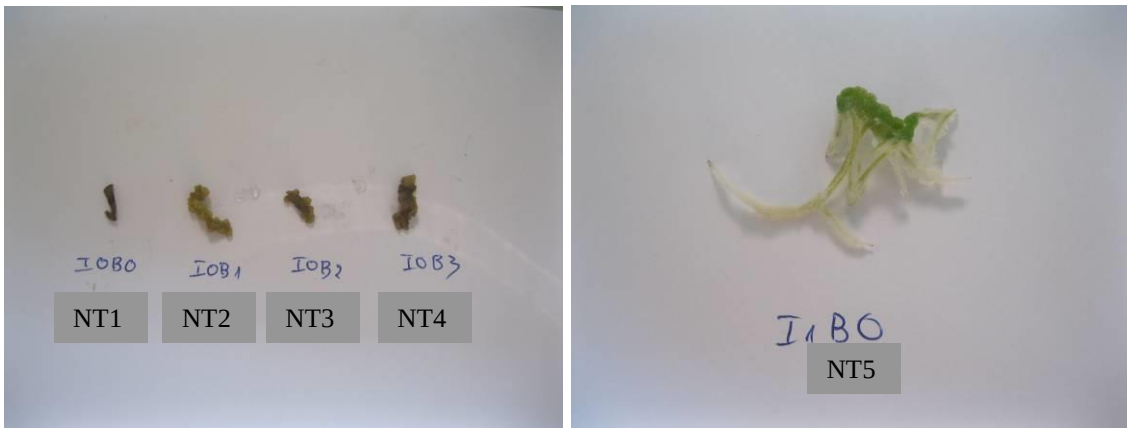
Bảng 3. Trạng thái mẫu lát mỏng tế bào lá cúc thời điểm 2, 4 và 6 tuần sau khi cấy

Nghiệm thức	Nồng độ chất ĐHST (mg/l)		Trạng thái mẫu tại các thời điểm SKC		
	IAA	BA	Tuần 2 SKC	Tuần 4 SKC	Tuần 6 SKC
1	0,0	0,0	Trương, xanh nhạt	Nâu đen	Chết
2	0,0	1,0	Trương, xanh	Vàng nâu	Chết
3	0,0	2,0	Trương, hơi nâu	Vàng nâu	Chết

Nghiệm thức	Nồng độ chất ĐHST (mg/l)		Trạng thái mẫu tại các thời điểm SKC		
	IAA	BA	Tuần 2 SKC	Tuần 4 SKC	Tuần 6 SKC
4	0,0	3,0	Trương, Xanh hơi nâu	Nâu đen	Chết
5	1,0	0,0	Trương, xanh, nhiều rễ	Xanh, nhiều rễ	Hình thành chồi
6	1,0	1,0	Trương, xanh	Hình thành chồi	Hình thành chồi
7	1,0	2,0	Trương, xanh	Hình thành chồi	Hình thành chồi
8	1,0	3,0	Trương, xanh	Xanh nhạt	Chết
9	2,0	0,0	Mẫu xanh nhạt	Nâu đen	Chết
10	2,0	1,0	Vàng nâu	Đen	Chết
11	2,0	2,0	Vàng nâu	Nâu đen	Chết
12	2,0	3,0	Vàng nâu	Nâu đen	Chết
13	3,0	0,0	Xanh hơi vàng	Ít rễ, vàng	Chết
14	3,0	1,0	Xanh nhạt	Nâu	Chết
15	3,0	2,0	Xanh nhạt	Xanh nâu	Chết
16	3,0	3,0	Xanh nhạt	Vàng nâu	Chết

Kết quả thí nghiệm trình bày ở bảng 3 cho thấy, ở các nghiệm thức có tổ hợp nồng độ BA và IAA khác nhau đáp ứng mẫu cũng khác nhau. Sau khi cấy 2 tuần, đa số mẫu ở các nghiệm thức đều trương lên có màu xanh. Tuy nhiên, sau 4 tuần nuôi cấy thì đa số mẫu ở các nghiệm thức trở nên nâu, vàng và bị chết sau 6 tuần. Chỉ có mẫu ở nghiệm thức 6 và nghiệm thức 7 hình thành chồi sau 4 tuần nuôi cấy; nghiệm thức 5 mẫu trương xanh có nhiều rễ và chỉ hình thành chồi sau 6 tuần nuôi cấy, điều này cũng phù hợp vì IAA là chất điều hòa sinh trưởng thực vật thuộc nhóm auxin, do đó chỉ có tác dụng kích thích sự hình thành rễ khi môi trường không có hoặc có rất ít cytokinin như ở nghiệm thức 5. Ở các nghiệm thức không có hoặc có IAA với nồng độ cao và BA chỉ kích thích lát mỏng tế bào lá cúc hình thành callus nhưng không thể tái sinh chồi bất định từ các callus này. Nghiên cứu của Lâm Ngọc Phương và Phạm Lê Tuấn (2007) trên mẫu lá cúc để nguyên và cắt phân nửa cũng

cho kết quả tương tự là khi môi trường MS bổ sung IAA và BA với tỷ lệ 1: 1 giúp lá cúc tái sinh chồi bất định sau 4 tuần nuôi cấy.



Hình 2. Trạng thái mẫu lát mỏng tế bào lá cúc sau khi cấy 4 tuần ở các nghiệm thức (NT) 1, 2, 3, 4 và 5

Bảng 4. Số chồi bất định tái sinh trực tiếp từ mẫu lát mỏng tế bào lá cúc sau 8 tuần nuôi cấy

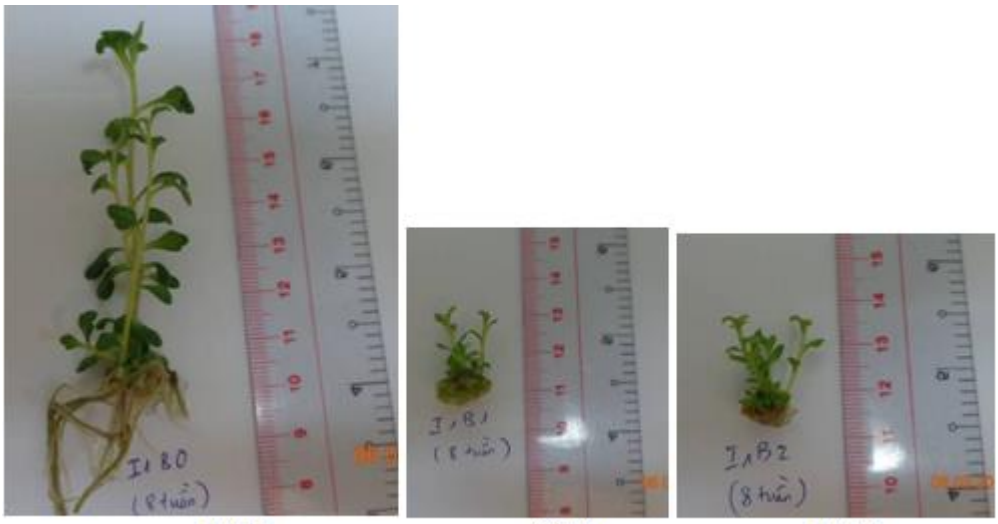
Nghiệm thức	Nồng độ chất ĐHST (mg/l)		Trạng thái mẫu sau khi cấy 8 tuần		
	IAA	BA	Số chồi/mẫu cấy	Chiều cao chồi (cm)	Trọng lượng tươi cụm chồi (g)
5	1,0	0,0	1,12 b	8,2 a	0,1226 a
6	1,0	1,0	2,40 a	1,76 b	0,0075 b
7	1,0	2,0	2,44 a	1,6 b	0,0111 b

Ghi chú: Trong cùng 1 cột, các số có ít nhất 1 chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% qua phép thử LSD.

Tại thời điểm 8 tuần SKC, chỉ các mẫu ở nghiệm thức 5, 6 và 7 còn sống và hình chồi bất định từ các mẫu cấy lát mỏng tế bào lá, mẫu bị nâu đen và chết ở các nghiệm thức còn lại. Tuy nhiên, ở 3 nghiệm thức có sự tái sinh chồi thì số lượng chồi hình thành, chiều cao chồi cũng như trọng lượng tươi cụm chồi cũng không bằng nhau. Qua kết quả thí nghiệm trình bày ở bảng 4 cho thấy, ở nghiệm thức 7 có số chồi bất định được tái sinh cao nhất đạt 2,44 chồi/mẫu cấy và khác biệt có ý

nghĩa thống kê ở mức 5% so với nghiệm thức 5 có số chồi tái sinh là 1,12 chồi/mẫu cấy và thấp nhất trong 3 nghiệm thức. Mặc dù số chồi tái sinh/mẫu cấy thấp nhất trong 3 nghiệm thức nhưng xét về chiều cao chồi và trọng lượng tươi cụm chồi thì ở nghiệm thức 5 chồi tái sinh phát triển nhanh nhất đạt chiều cao trung bình 8,2 cm, trọng lượng tươi cụm chồi cao nhất đạt 0,1226g và khác biệt có ý nghĩa thống kê so ở mức 5% so với 2 nghiệm thức còn lại. Chiều cao chồi ở nghiệm thức 7 đạt thấp nhất chỉ 1,6 cm sau 8 tuần cấy mẫu. Khan et al. (1994) nghiên cứu trên *Chrysanthemum morifolium* Ramat nhận thấy rằng sự gia tăng số chồi được ghi nhận trên môi trường MS bổ sung từ 0,5 đến 1,0 mg/l BA. Khi bổ sung 2,0 mg/l BA số chồi có tăng nhưng sự tăng trưởng của chồi bị kìm hãm biểu hiện qua việc hạn chế phát triển chiều cao của chồi.

Tuy nhiên, qua kết quả thí nghiệm có thể kết luận rằng nghiệm thức 7 (1,0 mg/l IAA + 2,0 mg/l BA) vẫn là nghiệm thức tối ưu được chọn với mục đích nhân nhanh chồi thông qua nuôi cấy lớp mỏng tế bào lá cúc lưới bởi số chồi được hình thành ở nghiệm thức này là cao nhất.



NT5 **NT6** **NT7**

Hình 3. Trạng thái mẫu nuôi cấy lát mỏng tế bào lá cúc sau 8 tuần nuôi cấy ở các nghiệm thức (NT) 5; 6 và 7

2.3. Thí nghiệm 3. Khảo sát môi trường nhân nhanh chồi hoa cúc trên môi trường có bổ sung BA

2.3.1. Mục đích nghiên cứu

Nhằm tìm ra nồng độ BA thích hợp nhất cho việc nhân nhanh chồi cây hoa cúc lưới trên môi trường MS.

2.3.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

a. Đối tượng nghiên cứu

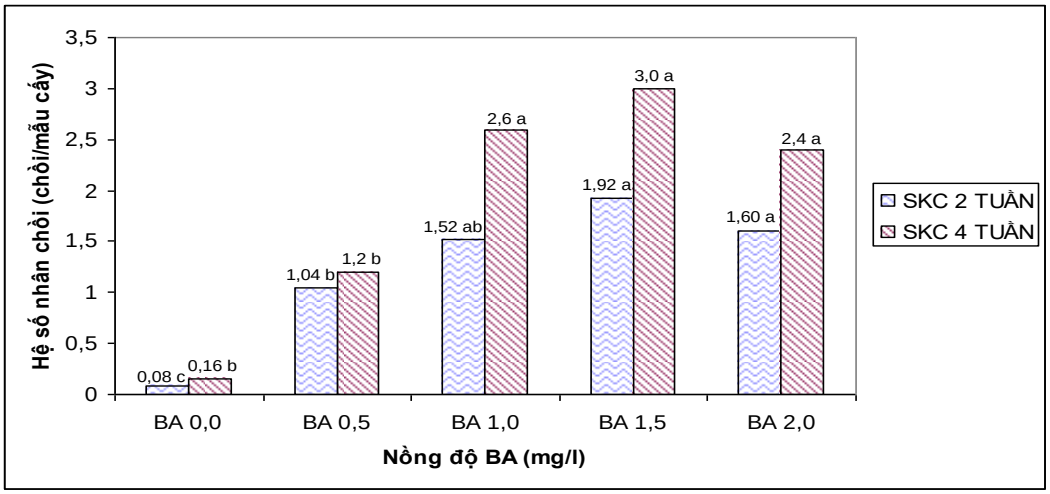
- Chồi ngọn cây hoa cúc lưới được tái sinh từ thí nghiệm 2.
- Môi trường MS được bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật BA

b. Phương pháp nghiên cứu

Các chồi được tái sinh từ thí nghiệm 2 được cấy chuyền riêng lẻ sang môi trường MS có bổ sung 10% (v/v) nước dừa; 0,5 mg/l NAA; 30g/l saccharose; BA với các nồng độ: 0,0 mg/l; 0,5 mg/l; 1,0 mg/l; 1,5 mg/l và 2,0 mg/l và pH môi trường được điều chỉnh = 5,8. Thí nghiệm gồm 5 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 5 lần, mỗi lần là 1 keo cấy 5 chồi.

Chỉ tiêu theo dõi: hệ số nhân chồi (số chồi/mẫu cấy) tại thời điểm sau khi cấy (SKC) 2 tuần và 4 tuần.

2.3.3. Kết quả nghiên cứu



Ghi chú: Trên đỉnh các cột có dạng giống nhau, các số có ít nhất 1 chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% qua phép thử LSD

Hình 4. Hệ số nhân chồi cây hoa cúc lưới sau thời gian 2 và 4 tuần nuôi cấy

Cytokinin là chất điều hòa sinh trưởng thực vật thường được sử dụng để kích thích sự tăng trưởng và phát triển trong đó Kinetin và Benzyladenin thường được sử dụng nhất trong nuôi cấy mô. Qua kết quả trình bày ở hình 4 cho thấy chất điều hòa sinh trưởng thực vật Benzyladenin (BA) có ảnh hưởng lớn đến khả năng nhân nhanh chồi cây hoa cúc lưới. Có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5% giữa các nghiệm thức bổ sung và không bổ sung BA vào môi trường nuôi cấy. Sau 4 tuần nuôi cấy số chồi/mẫu cấy có tăng so với thời điểm SKC 2 tuần.

Tại thời điểm 2 tuần SKC, ở nghiệm thức 4 có bổ sung 1,5 mg/l BA vào môi trường nuôi cấy cho hệ số nhân chồi cao nhất đạt 1,92 chồi/mẫu cấy. Mặc dù hệ số nhân chồi ở nghiệm thức 4 không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với nghiệm thức 3: 1,52 chồi/mẫu cấy và nghiệm thức 5: 1,60 chồi/mẫu cấy nhưng khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 2 nghiệm thức còn lại. Nghiệm thức 1 cho hệ số nhân chồi thấp nhất chỉ đạt 0,08 chồi/mẫu cấy. Qua biểu đồ trên cũng cho thấy rằng, khi hàm lượng BA bổ sung vào môi trường nuôi cấy tăng dẫn đến hệ số nhân chồi của các chồi cây hoa cúc lưới nuôi cấy tăng theo. Tuy nhiên, khi bổ sung BA vượt mức 1,5 mg/l làm cho hệ số nhân chồi giảm lại hay nói cách khác, khi hàm lượng BA trong môi trường nuôi cấy cao hơn 1,5 mg/l có tác động ức chế sự nhân chồi của cây hoa cúc lưới.

Tại thời điểm 4 tuần SKC, kết quả thí nghiệm cũng tương tự thời điểm 2 tuần SKC chỉ khác là số chồi có tăng nhiều hơn. Hệ số nhân chồi đạt cao nhất đạt 3,0 chồi/mô ở nghiệm thức 4 và thấp nhất vẫn ở nghiệm thức 1 chỉ đạt 0,16 chồi/mô. Các kết quả nghiên cứu cho thấy rằng, để kích thích sự hình thành chồi trong nuôi cấy mô có thể sử dụng chỉ cytokinin hoặc kết hợp giữa cytokinin và auxin. Việc sử dụng chỉ BA trên cúc cho thấy hiệu quả tạo chồi cao khi nồng độ 1,0 mg/l (Karim et al., 2002). Tuy nhiên, khi kết hợp giữa cytokinin và auxin cụ thể là giữa BA và IAA thì cần nồng độ BA cao hơn IAA mới có hiệu quả trong việc nhân chồi trên *Chrysanthemum morifolium* (Karim et al., 2003). Kết quả nghiên cứu của Waseem et al. (2009) trên *Chrysanthemum morifolium* cũng cho thấy rằng, khi bổ sung BA vào môi trường nuôi cấy làm gia tăng số chồi hình thành từ mẫu cấy là chồi ngọn

với kết quả: số chồi/mẫu cấy đạt cao nhất ở nồng độ 1,0 mg/l BA với 4,1 chồi/mẫu cấy (tác giả chỉ bố trí thí nghiệm BA ở các nồng độ 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l), số chồi/mẫu cấy giảm có ý nghĩa thống kê khi nồng độ BA bổ sung ở mức 2,0 mg/l xuống còn 2,8 chồi/mẫu cấy.

Qua kết quả thí nghiệm này có thể kết luận rằng môi trường thích hợp nhất cho sự nhân nhanh chồi *in vitro* từ các mẫu chồi cây hoa úc lưới là môi trường cơ bản MS được bổ sung 10% (v/v) nước dừa; 0,5 mg/l NAA; 30g/l đường saccharose; 1,5 mg/l BA và pH = 5,8.

2.4. Thí nghiệm 4. Khảo sát môi trường ra rễ của chồi cây cúc lưới cấy mô dưới tác động của NAA

2.4.1. Mục đích nghiên cứu

Nhằm tìm ra nồng độ NAA bổ sung vào môi trường MS thích hợp nhất cho việc tạo rễ cây cúc lưới để tạo cây hoàn chỉnh trong qui trình nhân giống *in vitro*.

2.4.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

a. Đối tượng nghiên cứu

- Chồi cây cúc lưới đạt kích thước 4 -5 cm.
- Môi trường MS, chất điều hòa sinh trưởng thực vật NAA.

b. Phương pháp nghiên cứu

Cây cúc tăng trưởng đạt kích thước 4-5 cm được dùng làm nguyên liệu cho bố trí thí nghiệm tạo rễ. Mẫu cấy được cắt bỏ 1 phần nhỏ ở gốc và toàn bộ rễ (nếu có) để tạo điều kiện hấp thu tốt dưỡng chất từ môi trường nuôi cấy và tăng độ tin cậy cho thí nghiệm. Môi trường tạo rễ là môi trường MS bổ sung 30g/l saccharose. NAA được bổ sung ở 5 mức nồng độ: 0,0 mg/l; 0,5 mg/l; 1,0mg/l; 1,5 mg/l và 2,0 mg/l tương ứng với 5 nghiệm thức khác nhau. Trong thí nghiệm này, mỗi nghiệm thức được cấy 10 keo với mỗi keo là 1 lần lặp lại chứa 5 chồi.

- Chỉ tiêu theo dõi : số rễ tạo thành, chiều dài rễ (đo từ gốc cho đến đỉnh đầu của rễ dài nhất) sau 4 và 6 tuần nuôi cấy.

2.4.3. Kết quả nghiên cứu

Bảng 5. Sự hình thành rễ của chồi hoa cúc lưới sau 4 và 6 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	Tuần 4 sau khi cấy		Tuần 6 sau khi cấy	
	Số rễ/chồi	Dài rễ (mm)	Số rễ/chồi	Dài rễ (mm)
1	9,78 c	22,32 b	15,80 c	26,28 c
2	16,70 b	27,00 a	24,90 b	34,60 b
3	23,44 a	29,20 a	30,00 a	43,40 a
4	18,24 b	26,76 a	26,02 b	33,66 b
5	17,44 b	22,00 b	23,86 b	25,82 c

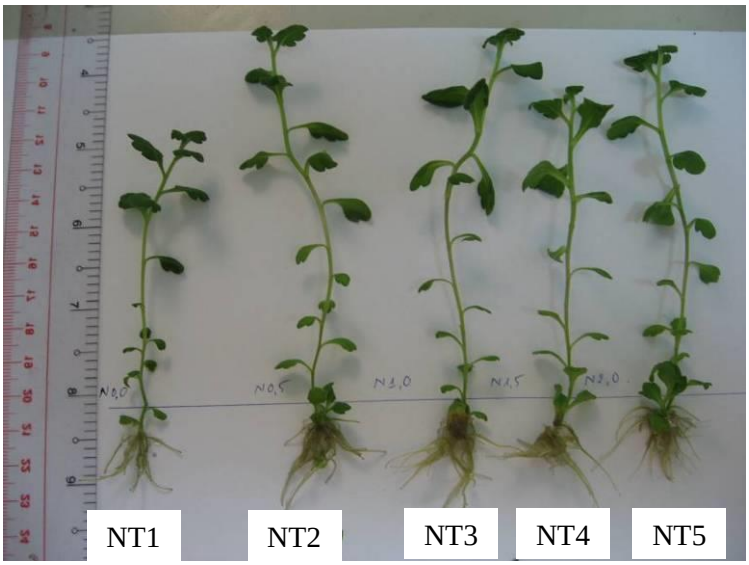
Ghi chú: Trong cùng 1 cột, các số có ít nhất 1 chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5% qua phép thử LSD.

Kết quả thí nghiệm (bảng 5) cho thấy NAA có ảnh hưởng rất lớn đến sự hình thành rễ cũng như chiều dài rễ từ mẫu cấy chồi cây hoa cúc lưới. Tại thời điểm 4 tuần sau khi cấy (TSKC), ở nghiệm thức 1 môi trường MS không bổ sung NAA thì số rễ/chồi là thấp nhất chỉ đạt 9,78 rễ/chồi. Số rễ/chồi tăng khi nồng độ NAA thêm vào môi trường tăng, đạt cao nhất 23,44 rễ/chồi ở nghiệm thức 3 (MS + 1,0 mg/l NAA) và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các nghiệm thức còn lại. Tuy nhiên, khi bổ sung NAA vào môi trường với lượng >1,0 mg/l lại có tác dụng ức chế sự hình thành rễ, số rễ/chồi giảm xuống lần lượt còn 18,24 và 17,44 ở nghiệm thức 4 (MS + 1,5 mg/l NAA) và nghiệm thức 5 (MS + 2,0 mg/l NAA). Bên cạnh việc tác động đến sự hình thành rễ, NAA còn tác động đến sự tăng dài của rễ, ở nghiệm thức 3 (MS + 1,0 mg/l NAA) rễ tăng dài nhất đạt trung bình 29,20 mm và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các nghiệm thức còn lại.

Tại thời điểm 6 TSKC, số rễ/chồi và chiều dài rễ ở tất cả các nghiệm thức có sự gia tăng so với thời điểm 4 TSKC. Tuy nhiên, nhìn chung nghiệm thức 3 (MS + 1,0 mg/l NAA) vẫn là nghiệm thức tối ưu cho quá trình tạo rễ từ chồi ngọn cây hoa cúc lưới nhằm tạo cây hoàn chỉnh đưa ra nhà lưới.

Nghiên cứu của Shatnawi et al. (2010) về tác động của auxin (IAA, NAA) lên sự hình thành rễ *Chrysanthemum morifolium* cấy mô cũng cho thấy rằng khi bổ

sung NAA vào môi trường nuôi cấy (môi trường MS) sẽ giúp tăng số rễ và chiều dài rễ. Tuy nhiên khi bổ sung vượt hàm lượng tối ưu sẽ có tác dụng ngược lại. Kết quả tương tự cũng được báo cáo bởi Singh và Arora (1995) khi nghiên cứu trên *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv.



Hình 5. Sự hình thành rễ của chồi cây hoa cúc lưới sau 4 tuần nuôi cấy ở các nghiệm thức 1, 2, 3, 4 và 5.

2.5. Thí nghiệm 5. Thuần dưỡng cây con

2.5.1. Mục đích nghiên cứu

Nhằm tìm ra giá thể phù hợp để cây ra ngôi đạt tỷ lệ sống cao nhất.

2.5.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

a. Đối tượng nghiên cứu

- Cây cúc lưới cấy mô có rễ, thân, lá hoàn chỉnh.

- Các giá thể với các thành phần: mụn xơ dừa, cát (cát sông đã được bơm lên khoảng 7 năm tại Khu Thực nghiệm Trồng trọt Trường Đại học Trà Vinh), tro trấu.

b. Phương pháp nghiên cứu

Cây cúc lưới cấy mô được tạo rễ trong môi trường tối ưu ở thí nghiệm 4 nhằm tạo thành cây hoàn chỉnh. Sau 1 tuần nuôi cấy, các keo/bịch chứa cây được mang ra nhà lưới có che mát để 1 tuần cho cây thích nghi. Sau đó, cây con được lấy ra khỏi bình NCM, loại bỏ agar bám trên rễ và xử lý bằng dung dịch thuốc diệt nấm. Cây

con được bố trí vào các nghiệm thức thuần dưỡng với các giá thể khác nhau, mỗi nghiệm thức gồm 100 cây con, 3 lần lặp lại.

+ Nghiệm thức 1: mụn xơ dừa: cát tỉ lệ 1:1.

+ Nghiệm thức 2: tro trấu: cát tỉ lệ 1:1.

+ Nghiệm thức 3: mụn xơ dừa: tro trấu tỉ lệ 1:1.

- Chỉ tiêu theo dõi: tỉ lệ sống sót của cây trong điều kiện thuần dưỡng ngoài nhà lưới sau 4 tuần.

2.5.3. Kết quả nghiên cứu

Bảng 6. Tỷ lệ sống của cây cúc lưới sau khi ra ngôi 4 tuần ngoài nhà lưới

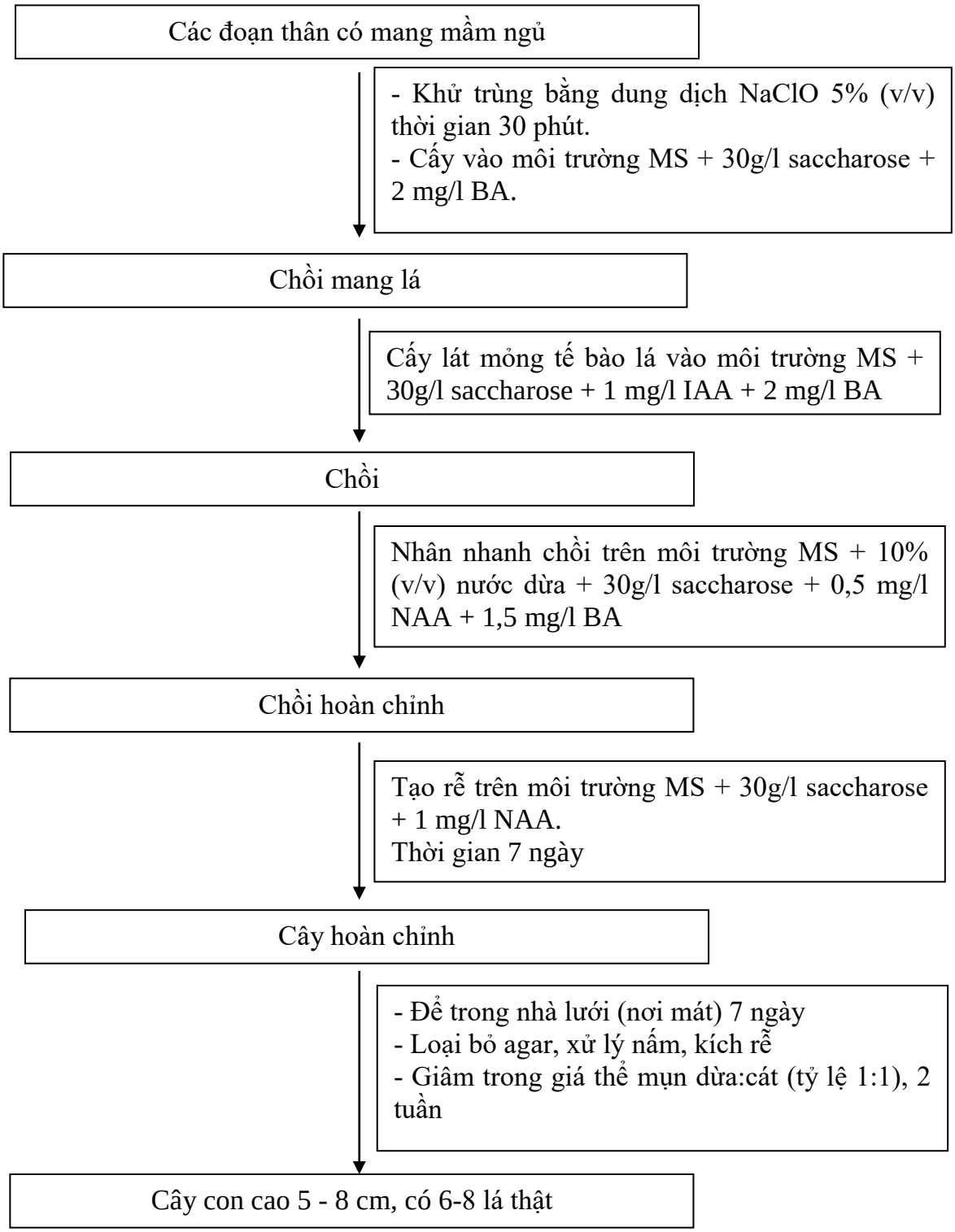
Nghiệm thức	Tỷ lệ sống của cây con (%)
1	95,00 a
2	59,67 b
3	69,00 b

Ghi chú: Trong cùng 1 cột, các số có ít nhất 1 chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% qua phép thử LSD.

Kết quả thí nghiệm trình bày ở bảng 6 cho thấy thành phần giá thể có ảnh hưởng rất lớn đến tỷ lệ sống của cây cúc lưới giai đoạn ra ngôi. Cây con được thuần dưỡng trên nền giá thể ở nghiệm thức 1 cho tỷ lệ sống của cây con cao nhất đạt 95% và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các nghiệm thức còn lại. Mặc dù không khác biệt thống kê so với nghiệm thức 3 nhưng ở nghiệm thức 2 có tỷ lệ cây sống thấp nhất chỉ đạt 59,67%. Nghiệm thức 2 và 3 cho tỷ lệ cây sống thấp do tro trấu với tỷ lệ cao (chiếm 50% cơ chất) nên hàm lượng các muối cao, gây mặn cơ chất không phù hợp với cây cúc giai đoạn còn nhỏ. Kết quả thăm dò từ các hộ nông dân ở làng hoa Long Đức cho thấy khi thuần dưỡng cây cúc con trước khi trồng nông dân chủ yếu chỉ sử dụng mụn dừa và phân bò mà không hoặc chỉ sử dụng với lượng rất ít tro trấu. Riêng đối với cát khi được phối trộn với mụn xơ dừa và cát giúp tạo cơ cấu chặt hơn, giúp cây đứng vững và thoát nước tốt.

Hình 6. Cây cúc lưới nuôi cấy mô được thuần dưỡng sau 4 tuần trong nhà lưới

Từ các kết quả nghiên cứu nêu trên, qui trình vi nhân giống cây hoa cúc lưới được khái quát như sau:



Hình 7. Qui trình vi nhân giống cây hoa cúc lưới tại Trường Đại học Trà Vinh

2.6. Thí nghiệm 6. Trồng và xử lý ra hoa trên cây cúc lưới nuôi cấy mô

2.6.1. Mục đích nghiên cứu

Đánh giá khả năng ra hoa của cây cúc lưới trồng tại khu thực nghiệm trường Đại học Trà Vinh.

2.6.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

a. Đối tượng nghiên cứu

Cây cúc lưới nuôi cấy mô sau khi được thuần dưỡng 2 tuần ở nghiệm thức tối ưu được chọn ở thí nghiệm 5.

b. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 1 nhân tố là cách thức xử lý ra hoa với 3 nghiệm thức: (1) đối chứng: để cây ra hoa tự nhiên; (2) Xử lý ngày ngắn bằng cách che sáng liên tục từ 16 giờ đến sáng hôm sau khi cây được 45 ngày tuổi sau khi trồng đến khi cây phân hóa mầm hoa và (3) xử lý hóa chất $KClO_3$ với lượng 4g/m^2 cùng thời điểm với xử lý che sáng. Mỗi nghiệm thức gồm 100 cây với 3 lần lặp lại.

Tuy nhiên trước và trong thí nghiệm này, chúng tôi chuẩn bị đất trồng, phân hữu cơ, chế độ tưới nước, phân bón, phòng trừ sâu bệnh hại cúc được tiến hành như sau:

- Chuẩn bị phân hữu cơ: thành phần gồm: mụn xơ dừa đã cũ (nếu mụn xơ dừa mới cần xử lý với nước vôi 2,5% nhằm loại bỏ tanin), phân bò oai. Ủ theo lớp mụn xơ dừa, phân bò thành đống cùng với chế phẩm vi sinh chứa nấm *Trichoderma*. Tỷ lệ mụn xơ dừa: phân bò là 3:2, thời gian ủ 2 tháng.

- Chuẩn bị đất: trước khi trồng khoảng 1/2 tháng đất được lên luống với chiều rộng bề mặt luống 80cm, chiều cao từ mặt đất đến mặt luống 10 cm. Đất trên luống được băm nhỏ rồi xử lý với vôi bột (10 kg/100m^2). Đào hố nhỏ có khoảng cách 20x20cm sau đó cho phân hữu cơ đã ủ oai vào.

- Thời gian trồng: 04/10/2013.

- Diện tích trồng: 100 m^2.

- Chế độ tưới nước: vào những trời nắng, khô cây được tưới nước bằng thùng vòi hoa sen 2 lần/ngày vào sáng sớm khoảng 7 giờ và chiều mát khoảng 15 - 16 giờ.

- Phân bón: phân chuồng ủ oai (khoảng 600 kg); phân hóa học sử dụng là: 5 kg N-P-K (16-16-8), 3 kg ure, 15 kg lân hữu cơ vi sinh.

+ Bón lót toàn bộ lượng phân chuồng và phân lân hữu cơ vi sinh.

+ Sau khi trồng 5 ngày tiến hành pha loãng phân ure với lượng 1 muỗng ăn canh cho thùng 8 lít nước tưới vào gốc. Sau đó định kỳ 7 ngày tưới phân ure + N-P-K (16-16-8) ngâm và pha loãng cho cúc đến khi cây ra hoa kích thước khoảng 1,5 cm.

- Phòng trừ sâu, bệnh: sử dụng các loại thuốc như Dupont Prevathon để phòng trừ sâu hại; Actara phòng trừ rầy chích hút; sử dụng Ridomil gold để trừ nấm bệnh trên cúc.

Chỉ tiêu theo dõi: chiều cao cây khi cây đã ra hoa hoàn chỉnh, thời gian phân hóa mầm hoa, tỷ lệ ra hoa, số nhánh/cây, kích thước hoa.

2.6.3. Kết quả nghiên cứu

Bảng 7. Một số đặc điểm sinh trưởng của cây hoa cúc lưới cấy mô được trồng thử nghiệm tại Trường Đại học Trà Vinh sau 60 ngày trồng

Nghiệm thức	Chiều cao cây (cm)	Tỷ lệ ra hoa (%)	Số nhánh/cây
(1) Cây ra hoa tự nhiên	37,2 a	100	8,3 a
(2) Xử lý che sáng	37,3 a	100	8,0 a
(3) Xử lý $KClO_3$ 4g/m^2	37,6 a	100	8,2 a

Ghi chú: Trong cùng 1 cột, các số có ít nhất 1 chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5% qua phép thử LSD.

Do cây đã trưởng thành mới tiến hành che sáng và xử lý $KClO_3$ nên chiều cao cây và số nhánh/cây giữa các nghiệm thức không có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê (bảng 7). Sau khi trồng 55 ngày cây đã phân hóa mầm hoa, tỷ lệ ra hoa Của cây hoa cúc lưới được trồng thử nghiệm ở các nghiệm thức là 100%. Cúc là cây

ngày ngắn, cây sẽ ra hoa khi điều kiện đêm dài hơn ngày và thời điểm trồng lại rơi ngay vào điều kiện này nên cây sẽ ra hoa mà không cần xử lý hóa chất hay che tối.

Xét về chiều cao cây, khi cây đã ra hoa hoàn chỉnh (111 ngày sau khi trồng) cây cúc lưới chỉ đạt chiều cao trung bình 40 cm tính từ cổ rễ, chiều cao này chỉ đạt khoảng 50% so với cây cúc mẹ mua về từ Đà Lạt để vô mẫu. Tuy nhiên, theo Trung tâm Khuyến nông - Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn tỉnh Lâm Đồng, có thể chiếu sáng bổ sung để tăng chiều cao của cây (http://khuyennonglamdong.gov.vn).

Kích thước hoa, đường kính hoa trung bình là 6,3 cm và không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức. Kích thước này tương đương với kích thước hoa cúc Tiger đang được bà con tại làng hoa Long Đức trồng để bán nguyên cây. Bên cạnh đó, chúng tôi tiến hành thêm thí nghiệm là ở mỗi nghiệm thức, chúng tôi chọn ngẫu nhiên 1 luống và tiến hành tỉa các chồi phụ và nụ phụ khi nụ có kích thước bằng đầu đũa ăn để mỗi cây chỉ còn lại một bông. Kết quả thí nghiệm cho thấy có sự khác biệt lớn về kích thước hoa giữa cây chừa 1 bông và nhiều bông. Đối với cây chỉ có 1 bông, đường kính hoa đạt trung bình 8,9 cm, kích thước này tương đương với kích thước hoa của hoa từ cây mẹ lấy về từ Đà Lạt và hoa cúc lưới được bày bán tại các cửa hàng hoa tươi tại Trà Vinh.

a **b**

Hình 8. Đường kính hoa cúc lưới ở cây để nhiều bông (a) và cây để 1 bông (b)

Về màu sắc, hoa có màu vàng chanh nhạt hơn cúc Tiger nhưng đậm hơn cúc vàng Đài Loan.

Về kiểu dáng hoa: khi hoa nở hoàn chỉnh, các cánh hoa phía ngoài lận xuống phía dưới nhường chỗ cho các cánh hoa phía trong, nhìn xa trông giống như bông hoa vạn thọ lớn (hình 9a). Ngoài ra, chúng tôi còn tiến hành thí nghiệm bấm ngọn từ các cây cúc lưới cấy mô để chuyển giao cho nông dân tại làng hoa Long Đức trồng thử nghiệm. Khi trồng bằng chồi ngọn trong chậu nhỏ để bàn và chỉ bấm ngọn 1 lần kết quả cho thấy tỷ lệ phát triển nhánh từ mầm ngủ thân cây là rất tốt, mỗi cây hình thành từ 7-10 nhánh, chiều cao giữa các nhánh tương đương nhau tạo cho tầng bông của cây rất đều (hình 9b).

a **b**

Hình 9. Kiểu dáng hoa khi nở hoàn chỉnh (a); Chồi ngọn được trồng trong chậu nhỏ để bàn (b)

Tóm lại, qui trình trồng cúc lưới ra hoa vào vụ Đông Xuân tại khu thực nghiệm Trường Đại học Trà Vinh có thể tóm tắt qua các bước sau:

<u>Bước 1</u>: chuẩn bị đất

Đất được lên luống với chiều rộng bề mặt luống 80cm, cao 10 cm, đất được băm nhỏ rồi xử lý với vôi bột (10 kg/100m^2). Đào hố nhỏ có khoảng cách 20 x 20cm sau đó cho phân hữu cơ đã ủ oai vào.

<u>Bước 2</u>: trồng và chăm sóc

- Cây đem trồng sau khi đã ra ngôi ngoài nhà lưới 2 tuần; tưới nước 2 lần/ngày vào sáng sớm và chiều mát.

- Sau khi trồng 5 ngày tiến hành pha loãng phân ure với lượng 1 muỗng ăn canh cho thùng 8 lít nước tưới vào gốc. Sau đó định kỳ 7 ngày tưới phân ure + N-P-

K (16-16-8) ngâm và pha loãng cho cúc đến khi cây ra hoa kích thước khoảng 1,5 cm.

- Phòng trừ sâu, bệnh: sử dụng các loại thuốc như Dupont Prevathon để phòng trừ sâu hại; Actara phòng trừ rầy chích hút; sử dụng Ridomil gold để trừ nấm bệnh trên cúc.

<u>Bước 3</u>: xử lý ra hoa

Trồng vào vụ Đông Xuân cây ra hoa tự nhiên mà không cần xử lý, nếu trồng vào vụ khác có thể xử lý bằng $KClO_3$ hoặc che sáng.

Nhóm thực hiện đề tài đã tổ chức Hội thảo *"Vi nhân giống và trồng thử nghiệm cây hoa cúc lưới tại Trà Vinh"* tại Trường Đại học Trà Vinh ngày 17 tháng 1 năm 2013 với đại biểu tham dự là các chuyên gia trồng trọt từ khoa Nông nghiệp - Thủy sản, Trung tâm Khuyến nông - Khuyến ngư tỉnh Trà Vinh, Trạm Khuyến nông - Khuyến ngư Thành phố Trà Vinh và các hộ nông dân trồng hoa lâu năm (từ 20 năm trở lên) tại làng hoa Long Đức tỉnh Trà Vinh. Các Đại biểu được tham quan cây cấy mô và mô hình trồng tại khu thực nghiệm trường Đại học Trà Vinh. Trong Hội thảo, đa số đại biểu đánh giá cao về cây hoa cúc lưới được nhân giống và trồng thử nghiệm tại khu thực nghiệm Trường Đại học Trà Vinh cũng như được chuyển giao cho nông dân. Tuy nhiên, các đại biểu cũng đóng góp một số ý kiến như sau: (1) đối với cây cúc lưới chỉ để 1 bông/cây thì khoảng cách trồng nên giảm lại còn 15 x 15 cm; (2) Nên thí nghiệm trồng kết hợp treo đèn để khảo sát sự đáp ứng tăng chiều cao của cây.

Qua thảo luận các đại biểu cho rằng đối với cây hoa cúc lưới được nuôi cấy mô, thời gian tới có 3 hướng để phát triển: Một là, trồng để cắt cành (chỉ để 1 bông/cây); hai là, trồng chậu để bàn để bán vào dịp tết; ba là, trồng cây nhiều bông và nhổ bán nguyên cây như cúc Tiger. Cũng trong Hội thảo này, các cơ quan chức năng (Trung tâm Khuyến nông - Khuyến ngư) và nông dân tại làng hoa bày tỏ mong muốn được hỗ trợ giống để trồng thử nghiệm ngoài nông dân.

Qua các kết quả nghiên cứu cũng như qua Hội thảo cho thấy triển vọng để phát triển giống hoa này tại Trà Vinh là rất lớn. Đó cũng là thành công bước đầu của đề tài cũng như niềm động viên đối với cán bộ tham gia thực hiện đề tài.

Hình 10. Hội thảo về cây hoa cúc lưới được tổ chức tại Trường Đại học Trà Vinh

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

3.1. Kết luận

- Dung dịch NaClO 5% (v/v) thời gian khử trùng 30 phút là thích hợp nhất để Khử trùng mẫu cấy là các đoạn thân cây hoa cúc lưới cho tỷ lệ mẫu vô trùng đạt 68% và tỷ lệ mẫu sống tái sinh 64% sau 4 tuần.

- Chồi bất định chỉ được hình thành từ mẫu nuôi cấy lớp mỏng tế bào lá cúc lưới trên môi trường ở nghiệm thức 5, 6 và 7. Trong đó, mẫu cấy ở nghiệm thức 7 cho số chồi bất định được tái sinh/mẫu cấy là cao nhất đạt 2,44 chồi/mẫu cấy sau 8 tuần.

- Đối với mẫu cấy là chồi ngọn, hệ số nhân chồi đạt cao nhất ở nghiệm thức 4 với 3,0 chồi/mẫu cấy sau 4 tuần.

- Số rễ/chồi và chiều dài rễ đạt cao nhất sau 4 và 6 tuần nuôi cấy trên môi trường ở nghiệm thức 3.

- Giai đoạn thuần dưỡng cây con đạt tỷ lệ sống cao nhất (95%) trên nền giá thể mụn xơ dừa : cát (tỷ lệ 1:1).

- Thời điểm trồng 04/10/2013, cây ra hoa sau 55 ngày trồng, không có sự khác biệt về tỷ lệ ra hoa giữa các nghiệm thức: che sáng, xử lý $KClO_3$ và để cây ra hoa tự nhiên; số nhánh/cây đạt trung bình 8 nhánh; đối với cây có trung bình khoảng 8 bông có kích thước hoa trung bình đạt 6,3 cm; đối với cây chỉ để 1 bông kích thước bông trung bình đạt 8,9 cm.

3.2. Kiến nghị

- Tiếp tục trồng cây cúc lưới ở các thời vụ khác nhau và trên các loại đất khác nhau để có đánh giá khách quan về khả năng ra hoa cũng như một số đặc điểm sinh trưởng của cây cúc lưới tại Trà Vinh.

- Trồng và bố trí thí nghiệm có chiếu ánh sáng đèn để đánh giá khả năng tăng chiều cao cây cúc lưới khi trồng ở vụ Đông Xuân.

3.3. Hướng phát triển của đề tài

Qua những kết quả nghiên cứu đạt được và Hội thảo cho thấy cây hoa cúc lưới rất có triển vọng phát triển tại Trà Vinh trong thời gian sắp tới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Battacharya P., Dey B., Das N. and Bhacttacharya B.C. 1990. Rapid mass propagation of *Chrysanthemum morifolium* by callus culture derived from stem and leaf explant. Plant Cell Report. 9: 493-422.

[2] Đào Thanh Vân và Đặng Thị Tố Nga. 2007. Giáo trình cây hoa. NXB Nông nghiệp

[3] Đặng Văn Đông, Đinh Thế Lộc. 2003. Công nghệ trồng hoa mới cho thu nhập cao - hoa cúc. NXB Lao động - Xã hội.

[4] Đỗ Bé Thảo. 2009. Khảo sát môi trường tạo rễ và tiền thuần dưỡng cây hoa Cúc "Farm Tím" (*Chrysanthemum* sp.) *IN VITRO*. Luận văn tốt nghiệp đại học., chuyên ngành hoa viên cây cảnh. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.

[5] Erler and Siegmum. 1986. Year book of the International Horiculture Statistics, USA. pp. 44

[6] Gul A. 2001. Micropropagation of Chrysanthemum. M. Sc thesis. Department of Botany, University of Peshawa.

[7] H. L. 2009. Về 2 dự án ứng dụng KHCN nhân giống hoa tại Bình Định. Tạp chí Khoa học và Công nghệ. Số 1/2009.

[8] Hoàng Ngọc Thuận. 2003. Kỹ thuật trồng hoa và cây cảnh. Bài giảng cho các lớp cao học, Khoa Nông học, Trường Đại học Nông nghiệp I Hà Nội.

[9] Jaim A.T.S. 2003. Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. African journal of biotechnology. 2 (12): 683-691.

[10] Karim M.Z, Amin M.N, Azad M.A.K., Begum F., Islam M.M. and Alam R. 2002. Effect of different plant growth regulators on *in vitro* shoot multiplication of *Chrysanthemum morifolium* through *in vitro* culture. Online journal of biological sciences. 3(6): 553-560

[11] Karim M.Z, Amin M.N, Azad M.A.K., Begum F., Islam M.M. and Alam R. 2003. Rapid multiplication of *Chrysanthemum morifolium* through *in vitro* culture. Pakistan journal of biological sciences. 5(11): 1170-1172

[12] Khan M. A., Khanam D, Ara K.A. and Hossain A.K.M. 1994. *In vitro* plant regeneration in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Plant tissue culture. 4 (1):53-57.

[13] Lazar M and Cachita C. D. 1983. Micropropagation of chrysanthemums. III. *Chrysanthemum* multiplication *in vitro* from capitulum explants. Productia Vegetala Horticultura. 32 (1): 44-47

[14] Lâm Ngọc Phương và Phạm Lê Tuấn. 2007. Hiệu quả của IAA và BA đến sự tái sinh trực tiếp chồi từ lá của cây hoa cúc (*Chrysanthemum* sp.). Trong: Dương Tấn Nhựt (chủ biên). Công nghệ sinh học thực vật trong công tác nhân giống và chọn tạo giống hoa. Hội nghị Khoa học, năm 2007. Nhà xuất bản Nông nghiệp. TP. Hồ Chí Minh. Trang 87 - 92.

[15] Levin R., Gaha V., Tal B., Hirsch S., Denola D. and Vasil I. 1988. Automated plant tissue culture for mass propagation. Biotechnology. 6: 1035-1040.

[16] Murashige T and Skoog F (1962). A rivised medium for rapid growth and boiassays with tobaco tissue culture. Physiol-Plant (15): 473-439

[17] Nguyễn Mộng Thúy. 2009. Môi trường nhân nhanh chồi cây hoa cúc "Farm Tím" (*Chrysanthemum* sp.*)* bằng phương pháp nuôi cấy mô. Luận văn tốt nghiệp Đại học, chuyên ngành Hoa viên cây cảnh, Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Đại học Cần Thơ.

[18] Roest S and Bokelmann G.S. 1973. Vegatative propagation of *Chrysanthemum cinerariaefolium in vitro*. Sci. Hortic. 1 (1): 120 - 122.

[19] Singh K and Arora J.S. 1995. *In vitro* multiplication of *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. Riot. Journal Ornamental Hortic. 2 (1-2): 63 - 68

[20] Shatnawi, M., A. Al-Fauri, H. Megdadi, M.K. Al-Shatnawi, R. S. S. Abu-Romman and A. L. Al-Ghzawi, 2010. *In vitro* Multiplication of *Chrysanthemum morifolium* Ratmat and it is Responses to NaCl Induced Salinity. Jordan Journal of Biological Sciences, 3: 101-110

[21] Văn Hoàng Long, Bùi Văn Thế Vinh và Dương Tấn Nhựt. 2007. Giá thể Nylon trong ra rễ cây hoa cúc (*Chrysanthemum* spp.). Hội nghị khoa học năm 2007, NXB Nông nghiệp, trang 71-79.

[22] Waseem K., Jilani M.S. and Khan M.S. 2009. Rapid plant regeneration of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* L.) through shoot tip culture. African journal of biotechnology, 8(9): 1871-1877

Web site:

http://www.hoasenvietnam.org.vn/index.php/en/sanphamkhcn/157quytrinhkythuat/635-quy-trinh-cong-ngh-trng-hoa-cuc-chrysanthemum-sp

http://khuyennonglamdong.gov.vn/index.php?option=com_content&view=article&id=1378:quy-trinh-k-thut-trng-hoa-cuc&catid=48:quy-trinh-ky-thuat