

## NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ ĐẾN MÔ LILY SAPA (*Lilium poilanei* Gapnep) IN VITRO

Bùi Thị Thu Hương<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Ngọc Huyền<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Hương<sup>1</sup>, Đồng Huy Giới<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Học viện Nông nghiệp Việt Nam

### TÓM TẮT

Lily Sapa (*Lilium polanei* Gapnep) là một loại hoa quý hiếm trên thế giới, có màu hoa đẹp và hương thơm quyến rũ. Đây chính là nguồn gen có nghĩa trong chọn tạo giống, nhưng đã và đang bị khai thác nghiêm trọng. Chính vì vậy, nghiên cứu phát sinh hình thái *in vitro* nhằm mục đích nhân giống, bảo tồn và phát triển nguồn gen *Lilium* là rất cần thiết. Các mẫu lá và vảy củ lily được khử trùng bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 5 phút cho tỷ lệ mẫu sống sạch là 50% và 68,33%. Mẫu hoa chưa nở được khử trùng bởi dung dịch Javen 1,5% trong 7 phút là thích hợp với tỷ lệ mẫu nhị và bầu nhụy sống sạch tương ứng là 51,11% và 73,33%. Các vảy củ nuôi cấy trên môi trường MS có 0,1 mg/l BA khiến 43,42% mẫu tạo chồi lá; môi trường MS có 0,3 mg/l BA khiến 39,42% mẫu tạo củ với hệ số tạo củ 0,46. Môi trường MS có 0,5 mg/l NAA kích thích 55,56% vảy củ ra củ con, với hệ số nhân củ là 1,56. Môi trường MS có IBA với nồng độ từ 0,3 đến 1,2 mg/l; 2,4 D từ 0,25 đến 1,0 mg/l kích thích vảy củ tạo mô sẹo và củ con. Môi trường MS bổ sung 0,75 mg/l 2,4-D vào môi trường nuôi cấy vảy củ đã kích thích quá trình tạo mô sẹo cao nhất, mô sẹo vàng sáng, mềm. Ngoài ra, môi trường MS bổ sung 0,3 mg/l BA và 1 mg/l 2,4 D cũng khiến 25 % mẫu tạo củ và 43,33% mẫu tạo mô sẹo to cứng.

**Từ khóa:** *in vitro*, *Lilium poilanei*, lily Sapa, nuôi cấy mô, phát sinh hình thái.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hoa lily, thuộc chi *Lilium* là một loài hoa cao cấp có vẻ đẹp quyến rũ, có hương thơm và độ bền hoa cắt cành cao, rất được ưa chuộng từ lâu trên thế giới (Comber, 1949). Các loài lily tiến hóa đa dạng tạo ra rất nhiều loại hoa phong phú về kiểu dáng và màu sắc, hương thơm (De Jong, 1974). Đó là lí do, hoa lily không chỉ để trang trí mà còn được sử dụng để điều chế nước hoa, mỹ phẩm, kem chống lão hoá, mang lại lợi nhuận rất lớn (Grassotti, 1996). Do đó, các giống lily đã được chú ý phát triển ở rất nhiều nơi (Grassotti et al., 1990; Zhao et al., 1996; Baranova, 1996; Kim, 1996; Okubo, 2014) với nhiều loại hoang dại cũng như các giống lai (Beattie & White, 1993).

Tuy nhiên việc sản xuất hoa lily ở nước ta còn nhiều hạn chế về diện tích, năng suất, sản lượng dẫn đến giá thành hoa còn rất cao, một phần là do chúng ta còn phải nhập nội củ giống với chi phí ngoại tệ lớn. *Lilium poilanei* đang là một loài hoa rất hiếm trên thế giới, nguồn gen mang nhiều đặc điểm quý như màu sắc đa dạng, hoa bền đẹp và có hương thơm. Đây chính là những nguồn gen rất có nghĩa trong chọn tạo giống (Comber, 1949). Tuy nhiên, theo dữ liệu củ của Royal Horticulture Society (RHS) thì hiện nay, chưa có công bố nào về việc sử dụng nguồn gen này làm vật liệu để tạo ra

các giống thương mại. Hơn thế nữa, ở Việt Nam, loài hoa này đã từng bị khai thác nghiêm trọng để bán sang Trung Quốc, chính vì vậy, việc bảo tồn và phát triển nguồn gen này trong chọn tạo giống *Lilium* là rất cần thiết (Nguyễn Thị Phương Thảo, Vũ Quang Khánh, Cao Việt Anh, 2009). Từ khá lâu, các nhà khoa học đã cho rằng, nuôi cấy mô tế bào thực vật là một ứng dụng đầy tiềm năng trong nhân giống lily (Mai Xuân Lương, 1993). Tuy nhiên, mỗi giống cây nói chung, hay lily nói riêng có những phát sinh hình thái với các chất kích thích sinh trưởng khác nhau (Bùi Thị Thu Hương, Đồng Huy Giới, Bùi Văn Thang, 2017). Như nhận định của Stanilova & Zagorska (1993) cần nghiên cứu phát sinh hình thái để nhân giống các giống lily đang có nguy cơ tuyệt chủng như loài *Leucojum aestivum* L. và *Lilium rhodopaeum* Delip, cho thấy sự cần thiết bảo tồn các giống lily quý hiếm bằng nhân giống *in vitro*. Báo cáo này trình bày kết quả nghiên cứu sự phát sinh hình thái của các mẫu lily Sapa (*Lilium poilanei* Gapnep) nhằm tìm ra các thông số kỹ thuật thích hợp phục vụ cho nghiên cứu phát triển giống hay nhân *in vitro* cây *L. poilanei* Gapnep quý hiếm này và hơn nữa phục vụ công tác chọn tạo giống lily nói chung cho Việt Nam.

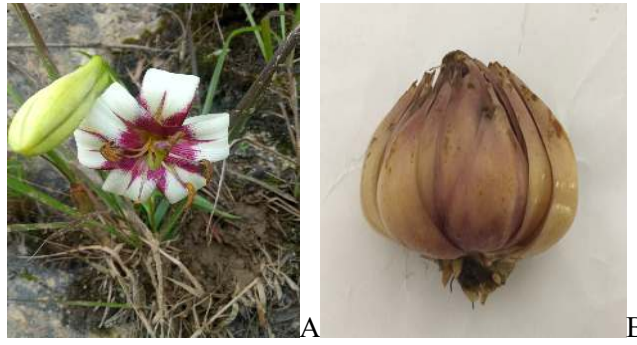
### 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Đối tượng nghiên cứu:

\* Corresponding author: dhgioi@vnua.edu.vn

Cây hoa *L. poilanei* Gagnep, cây lâu năm mọc tại các sườn núi đá Sapa, Lào Cai, Việt

Nam (hình 1).



Hình 1. Mẫu hoa, lá lily (A) củ (B) của lily Sapa (*Lilium poilanei* Gagnep)

(Chụp 3/2021 tại Sapa, Lào Cai, Việt Nam)

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Khả năng tạo nguồn vật liệu ban đầu *in vitro*

a. *Xử lý mẫu ban đầu*: Các mẫu lily gồm lá, hoa chưa mở, và vảy củ được tách từ củ không bị nhiễm nấm mốc, không dập nát. Chúng được rửa sạch dưới vòi nước chảy, sau đó được lắc 10 phút trong dung dịch xà phòng loãng và tiếp theo rửa lại bằng nước cất khử trùng 2 hoặc 3 lần, và đưa vào tủ cấy vô trùng. Trong tủ cấy, các mẫu được lắc trong cồn 70° trong 30 giây, rồi được tráng bằng nước cất khử trùng.

b. *Khử trùng mẫu bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1%, Javen (NaClO) 1,5%*

Các mảnh vảy củ, mảnh lá sau khi được xử lý ban đầu sẽ được tiến hành khử trùng bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1% ở các thời gian khác nhau là 3 phút, 5 phút, 7 phút, hoặc 9 phút. Sau đó, mẫu được rửa sạch bằng nước cất vô trùng từ 3 - 5 lần; thấm mẫu bằng giấy thấm vô trùng và cấy vào môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962).

Đối với mẫu bầu nhụy, bao phấn: Dựa theo nghiên cứu của Du et al., (2014) cho thấy mẫu hoa *Lilium poilanei* Gagnep khử trùng trong dung dịch Javen (NaClO) 1,5% trong thời gian 5 phút cho hiệu quả cao. Do đó, hoa chưa mở được ngâm trong Javen trong 3, 5, 7 hoặc 9 phút trong tủ cấy, sau đó mẫu được rửa sạch bằng nước cất vô trùng từ 3 - 5 lần, thấm mẫu bằng giấy thấm vô trùng và tách lấy phần bầu và nhụy và cấy mẫu vào môi trường MS.

Đánh giá mẫu sau 1 tuần với các chỉ tiêu tỉ

lệ mẫu sống sạch, tỉ lệ mẫu sống. Mỗi công thức lặp lại 3 lần, mỗi lần 20 mẫu, tiến hành theo dõi trong 2 tuần.

### 2.2.2. Sự phát sinh hình thái *in vitro* của các mẫu lily *L. poilanei* Gagnep.

\* Các mảnh lá (dài khoảng 1cm) được cấy vào môi trường MS có bổ sung nồng độ 0; 0,5; 1; 1,5; 2 mg/l 2,4-D. Sau 12 tuần nuôi cấy, theo dõi tỉ lệ mẫu phát sinh hình thái, tỉ lệ mẫu sống.

\* Lát cắt bầu nhụy dày khoảng 0,5 cm nuôi cấy vào môi trường MS và có bổ sung nồng độ 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1 mg/l BA. Sau 12 tuần nuôi cấy, đánh giá tỉ lệ mẫu phát sinh hình thái, tỉ lệ mẫu sống.

\* Các mẫu nhị, và bao phấn được nuôi cấy trong môi trường MS bổ sung 1 - 4 mg/l Picloram. Sau 12 tuần nuôi cấy, đánh giá tỉ lệ mẫu phát sinh hình thái, tỉ lệ mẫu sống.

\* Các vảy củ kích thước dài khoảng 2 - 3 cm, rộng 10 - 15 mm được nuôi cấy trên môi trường MS và bổ sung các chất điều tiết sinh trưởng khác nhau nhằm gây sự phát sinh hình thái của mẫu và đánh giá mẫu sau 8 tuần nuôi cấy với các chỉ tiêu phát sinh hình thái như tỷ lệ mẫu tạo chồi lá, tạo củ, tạo mô sẹo; hệ số tạo củ, tạo chồi, tạo mô sẹo (nếu có); đặc điểm mẫu.

Dựa vào các nghiên cứu của Yoshiji & Tsuyoshi (1979); Geetika et al., (2010), Tang et al., (2010), Bùi Thị Thu Hương & Trịnh Khắc Quang (2013) đã nuôi cấy mô lily trong môi trường MS bổ sung các chất điều tiết sinh trưởng như BA, α- NAA, 2,4-D... Do đó, các

mẫu lily Sapa được nuôi cấy trong môi trường MS có BA với các nồng độ 0; 0,1; 0,2; 0,3 hoặc 0,4 mg/l BA;  $\alpha$ -NAA với các nồng độ lần lượt 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 mg/l; IBA với nồng độ 0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2 mg/l; 2,4-D nhằm kích thích hình thành mô sẹo với các nồng độ 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25 mg/l 2,4-D; hoặc 0,3 mg/l BA và 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25 mg/l 2,4 D.

**2.2.3. Điều kiện thí nghiệm và Phương pháp xử lý số liệu**

- Môi trường nuôi cấy là MS bổ sung các chất điều tiết sinh trưởng, đường, than hoạt tính và nước dừa với các hàm lượng khác nhau tùy từng thí nghiệm. Giá trị pH của môi trường được điều chỉnh là 5,7 - 5,8.

- Môi trường nuôi cấy được hấp khử trùng ở

117<sup>0</sup>C, áp suất 1,4 atm trong 20 phút.

- Các thí nghiệm trong phòng thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi công thức 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 15 đến 20 mẫu/công thức tùy thí nghiệm.

Các số liệu thu được trong thí nghiệm được xử lý bằng chương trình Excel 2010 và phần mềm thống kê IRRISTAT.

**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Ảnh hưởng của thời gian sử dụng HgCl<sub>2</sub> 0,1%; Javen 1,5% đến hiệu quả vào mẫu cây lily *L. poilanei***

Vảy củ và mảnh lá được xử lý với HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 3, 5, 7, 9 phút và được cấy vào môi trường MS. Sau 1 tuần, kết quả thu được ở bảng 1.

**Bảng 1. Ảnh hưởng của HgCl<sub>2</sub> 0,1% đến mẫu lá và vảy củ *L. poilanei* sau 1 tuần nuôi cấy**

Thời gian tiếp xúc HgCl <sub>2</sub> (phút)	Tỷ lệ mẫu lá sống (%)	Tỷ lệ vảy củ sống (%)	Tỷ lệ mẫu lá sống sạch (%)	Tỷ lệ vảy củ sống sạch (%)
3	68,33	83,33	41,67	55,00
5	65,00	75,00	50,00	68,33
7	60,00	71,67	45,00	65,00
9	51,67	63,33	41,67	58,33

Kết quả bảng 1 cho thấy, HgCl<sub>2</sub> 0,1% có tác động đến sự sống của mẫu và tạo mẫu sống sạch sau 1 tuần nuôi cấy trên môi trường MS. Khi khử trùng lá và vảy củ lily trong thời gian 3 phút thì tỷ lệ mẫu sống cao nhất (68,33%; 83,33%); khử trùng trong thời gian 5 phút cho tỷ lệ mẫu lá và vảy củ sống sạch cao nhất (50%; 68,33%). Tang *et al.* (2010) cũng tiến hành khử trùng lá *Lilium Leucanthum* bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1% ở thời gian 6 phút cho tỉ lệ khử trùng cao. Ở thí nghiệm này, khi tăng thời gian khử trùng lên từ 3 phút lên 9 phút thì tỷ lệ mẫu

nhhiễm giảm hẳn, tuy nhiên một số mẫu có hiện tượng đen và chết. Tỷ lệ mẫu sống sạch thấp khi được khử trùng với HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 9 phút. Vì HgCl<sub>2</sub> là chất khử trùng độc không chỉ với vi sinh vật, mà với cả tế bào thực vật, nên khi tăng thời gian tiếp xúc khiến mẫu bị ngộ độc và dẫn đến kết quả là mẫu bị chết.

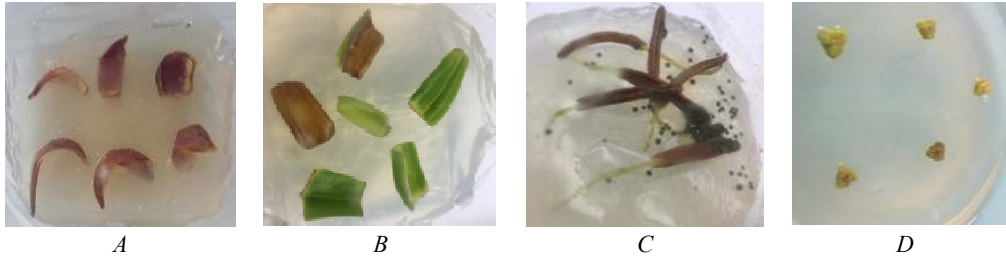
Hoa chưa nở được thu hoạch và được khử trùng trong Javen 1,5% rồi được rửa lại 3 đến 5 lần bằng nước cất đã khử trùng. Mẫu sau khi khử trùng và được cấy vào môi trường MS. Kết quả thu được ở bảng 2.

**Bảng 2. Ảnh hưởng của Javen 1,5% đến nhị và bầu nhị *L. poilanei* sau 1 tuần nuôi cấy**

Thời gian tiếp xúc NaClO (phút)	Tỉ lệ mẫu nhị sống (%)	Tỉ lệ mẫu bầu nhị sống (%)	Tỉ lệ mẫu nhị sống, sạch (%)	Tỉ lệ mẫu bầu nhị sống, sạch (%)
3	75,56	82,22	37,78	62,22
5	66,67	77,78	40,00	66,67
7	55,56	75,56	51,11	73,33
9	48,89	71,11	44,44	68,89

Từ kết quả ở bảng 2 cho ta thấy khi tăng thời gian khử trùng từ 3 phút đến 9 phút thì tỷ lệ mẫu sống giảm dần. Đối với công thức khử trùng với thời gian 3 phút, tỷ lệ mẫu nhị và bầu nhụy sống cao nhất 75,56% và 82,22%; trong khi khử trùng trong thời gian 9 phút, tỷ lệ mẫu

sống thấp nhất, 48,89% và 71,11%. Khử trùng với thời gian 7 phút cho tỷ lệ mẫu sống cao nhất là 55,56%; 75,56% và tỷ lệ mẫu sống sạch cao nhất là 51,11% và 73,33%. Kết quả này gần tương tự với công bố của Du *et al.* (2014) với hoa lily được khử trùng 5 phút là tốt nhất.



Hình 2. Vây củ *L. poilanei* (A), mảnh lá *L. poilanei* (B), nhị *L. poilanei* (C) và lát cắt bầu nhụy *L. poilanei* (D) sau khử trùng 1 tuần trong môi trường MS

### 3.2. Ảnh hưởng của một số chất điều tiết sinh trưởng đến lá và hoa *L. poilanei*.

Yoshiji & Tsuyoshi (1979) cho rằng, mẫu lá và cuống lá lily *Lilium rubellum* Baker cũng phát sinh hình thái *in vitro*. Với cây *L. poilanei*, các mảnh lá được cấy vào môi trường MS có bổ sung 2,4-D, sau 12 tuần nuôi cấy thu được kết quả ở bảng 3. Khi nồng độ 2,4D tăng từ 0 đến 2 mg/l, thì tỷ lệ mẫu chết tăng dần, đồng thời không có sự phát sinh hình thái. Tỷ lệ mẫu chết đạt 100% ở môi trường có 2 mg/l 2,4D. Kết quả phản ứng của mẫu lá nghiên cứu

có sai khác so với nghiên cứu của Tang *et al.*, (2010) khi mẫu mô lá *in vitro* tạo mô sẹo trong môi trường có 2,4 D.

Lát cắt bầu nhụy *L. poilnaei*, được cấy vào môi trường MS và có bổ sung BA. Sau 12 tuần nuôi cấy, thu được kết quả ở bảng 4 cho thấy, các bầu nhụy cũng không có phát sinh hình thái, hầu hết các mẫu trở nên nâu thẫm và chết dần ở môi trường bổ sung BA lần lượt từ công thức ĐC (0 mg/l) tới công thức 1 mg/l, đồng thời không có khả năng phát sinh hình thái.

Bảng 3. Ảnh hưởng của 2,4 D đến mảnh lá *L. poilanei* sau 12 tuần nuôi cấy

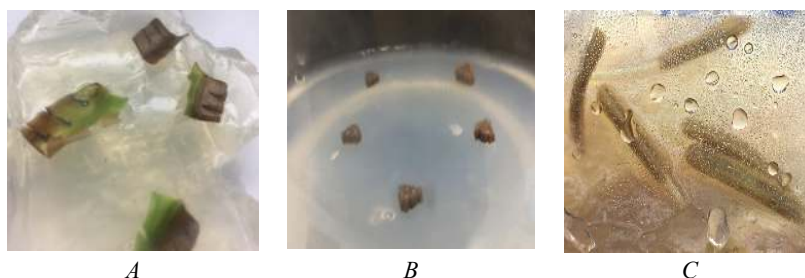
2,4D (mg/l)	Tỷ lệ mẫu phát sinh hình thái (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Đặc điểm hình thái mẫu
0	0	76,67	xanh vàng
0,5	0	56,67	mẫu vàng
1,0	0	33,33	vàng đậm, một vài mẫu xanh.
1,5	0	8,33	nâu, ít điểm xanh
2,0	0	0,0	nâu đen

Bảng 4. Ảnh hưởng của BA đến lát cắt bầu nhụy *L. poilanei* sau 12 tuần nuôi cấy

BA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu phát sinh hình thái (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Đặc điểm hình thái mẫu
0	0	70,00	Mẫu xanh
0,25	0	56,67	Mẫu xanh vàng
0,50	0	26,67	Mẫu vàng đậm
0,75	0	8,33	Mẫu nâu
1,00	0	1,67	Mẫu đen

Du *et al* (2014) đã nghiên cứu tạo phát sinh hình thái chỉ nhị, nhị của lily Sorbonne, Bernini và Robina. Với mẫu nhị lily *L. poilanei*, các mẫu nhị, và bao phấn được nuôi

cấy trong môi trường MS bổ sung 1- 4 mg/l Picloram nhưng không có phát sinh hình thái và chết (có màu vàng đen) sau 12 tuần nuôi cấy (số liệu không thể hiện ở bảng 4).



Hình 3. Mẫu lá *L. poilanei* trong môi trường MS bổ sung 2,4 D (A), lát cắt bầu nhụy lily *L. poilanei* trong môi trường MS bổ sung BA (B) và nhị *L. poilanei* nuôi cấy trong môi trường Picloram (C) sau 12 tuần nuôi cấy

### 3.3. Ảnh hưởng của một số chất đến vảy củ lily *L. poilanei*

Theo Takayama & Misawa (1979), vảy củ có khả năng tái sinh cao nhất trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Nghiên cứu trước đây của chúng tôi cũng cho thấy khả năng phát sinh hình thái của vảy củ của các giống lily rất cao

(Bùi Thị Thu Hương & Trịnh Khắc Quang, 2013). Do vậy, nghiên cứu này chúng tôi sử dụng các vảy củ có kích thước dài khoảng 2 đến 3 cm và cấy vào môi trường MS và có bổ sung BA nồng độ khác nhau. Sau 8 tuần nuôi cấy thu được kết quả ở bảng 5.

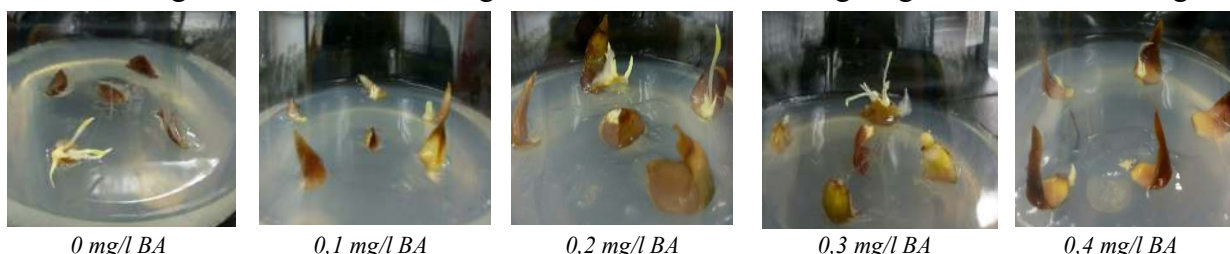
Bảng 5. Ảnh hưởng của BA đến vảy củ *L. poilanei* sau 8 tuần nuôi cấy

BA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi lá (%)	Số chồi/ mẫu	Tỷ lệ mẫu tạo củ (%)	Hệ số tạo củ (số mẫu/củ)	Đặc điểm củ
0	35,97 <sup>c</sup>	0,49 <sup>bc</sup>	24,93 <sup>d</sup>	0,19 <sup>d</sup>	nhỏ,
0,1	35,92 <sup>c</sup>	0,64 <sup>ab</sup>	29,44 <sup>c</sup>	0,21 <sup>d</sup>	nhỏ dài
0,2	39,91 <sup>b</sup>	0,63 <sup>ab</sup>	34,41 <sup>b</sup>	0,29 <sup>c</sup>	nhỏ dài
0,3	43,00 <sup>a</sup>	<b>0,75<sup>a</sup></b>	<b>39,42<sup>a</sup></b>	<b>0,46<sup>a</sup></b>	nhỏ, tròn,
0,4	<b>43,42<sup>a</sup></b>	<b>0,72<sup>a</sup></b>	34,42 <sup>b</sup>	0,39 <sup>b</sup>	nhỏ tròn
LSD <sub>0,05</sub>	1,75	0,13	4,72	0,057	
CV (%)	1,7	7,8	6,0	7,0	

Ghi chú: Các chữ cái a, b, c... trong cùng một cột biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa với  $\alpha = 0,05$ .

Từ kết quả bảng 5 cho ta thấy, các mẫu vảy củ của lily Sapa lại xuất hiện chủ yếu chồi lá (tỷ lệ khoảng 36% đến 43% mẫu, với số chồi lá/mẫu từ 0,5 đến 0,7) và tạo củ thấp (chỉ từ 24% đến gần 40%) khi bổ sung BA từ 0 đến 0,4 mg/l BA; tỷ lệ tạo củ lily *in vitro* thấp nhất ở công thức không có BA. Các củ này nhỏ, dài thể hiện chất lượng củ kém. Ở môi trường khi bổ

sung 0,3 mg/l BA thì hệ số tạo củ và tỷ lệ tạo củ cao nhất, 0,46; 39,42% đặc điểm hình thái tốt hơn cả, củ tròn, chồi mập. Kết quả này gần tương tự với công bố của Nguyễn Thị Phương Thảo và cộng sự, (2010), khi nuôi cấy mảnh vảy củ trên MS bổ sung 0,1 đến 0,5 mg/l BA khiến 16,67% đến 60% mẫu chỉ tái sinh chồi, và tỉ lệ BA càng tăng, tỉ lệ tạo chồi lá càng cao.



Hình 4. Vảy củ lily *L. poilanei* trong môi trường MS bổ sung BA sau 8 tuần nuôi cấy

Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, mô của từng loài và từng loại mô có phản ứng phát sinh hình thái khác nhau với chất điều hòa sinh trưởng khác nhau.  $\alpha$ -NAA cũng được bổ sung vào môi trường MS nuôi cấy mô vảy củ nhằm

kiểm tra sự phát sinh hình thái. Kết quả sau 8 tuần nuôi cấy được thu được ở bảng 6. Kết quả cho thấy, dù hệ số tạo củ của các mẫu sai khác không khác biệt, nhưng các mẫu nuôi cấy trong môi trường bổ sung  $\alpha$ -NAA có tỷ lệ tạo củ cao



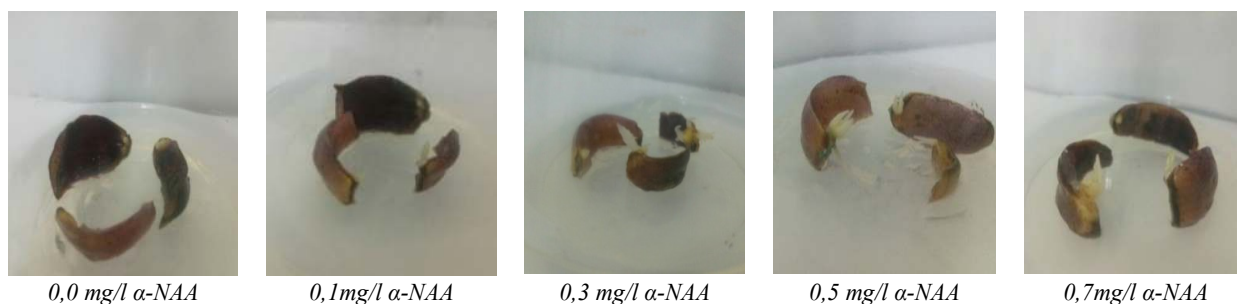
hơn hẳn so với công thức đối chứng (không bổ sung chất điều tiết sinh trưởng). Tỷ lệ mẫu tạo củ tăng dần ở môi trường bổ sung 0,1 đến 0,5 mg/l NAA (từ 37,78% đến 55,56%); cao nhất ở môi trường với nồng độ  $\alpha$ -NAA là 0,5 mg/l. Khi nồng độ  $\alpha$ -NAA lên 0,7 mg/l, tỷ lệ này

giảm xuống 51,11% nhưng vẫn cao hơn đối chứng. Tương tự, công bố của Vũ Hoài Sâm & Bùi Đức Huỳnh (2016) cũng đã chỉ ra rằng, 0,5 mg/l  $\alpha$ -NAA cho tỷ lệ tạo củ tốt nhất cho cây *Lilium Brownii* F.E. Brow.

**Bảng 6. Ảnh hưởng của  $\alpha$ -NAA đến vảy củ *L. poilanei* sau 8 tuần nuôi cấy**

$\alpha$ - NAA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo củ (%)	Hệ số tạo củ (lần)	Đặc điểm củ
0,0	24,45 <sup>c</sup>	1,16 <sup>a</sup>	Củ nhỏ
0,1	37,78 <sup>d</sup>	1,28 <sup>a</sup>	Củ nhỏ
0,3	44,45 <sup>c</sup>	1,39 <sup>a</sup>	Củ trung bình
0,5	<b>55,56<sup>a</sup></b>	1,56 <sup>a</sup>	Củ to
0,7	51,11 <sup>b</sup>	1,47 <sup>a</sup>	Củ to
CV (%)	4,0	3,2	
LSD <sub>0,05</sub>	3,24	0,82	

Ghi chú: Các chữ cái a, b, c... trong cùng một cột biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa  $\alpha = 0,05$ ; Củ nhỏ  $\leq 0,2$  cm;  $0,2$  cm < Củ trung bình  $\leq 0,5$  cm; Củ to > 0,5 cm.



**Hình 5. Vảy củ lily *L. poilanei* trong môi trường MS và  $\alpha$ -NAA sau 8 tuần nuôi cấy**

Để nghiên cứu ảnh hưởng của IBA đến sự phát sinh hình thái của mẫu lily nuôi cấy *in vitro*, các vảy củ được cấy vào môi trường MS

có bổ sung 0 đến 1,2 mg/l IBA. Sau 8 tuần nuôi cấy, thu được kết quả thể hiện ở bảng 7.

**Bảng 7. Ảnh hưởng của IBA đến vảy củ *L. poilanei* sau 8 tuần nuôi cấy**

IBA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)	Tỷ lệ mẫu tạo củ (%)	Đặc điểm mẫu
0	6,67 <sup>d</sup>	5,43 <sup>c</sup>	vảy vàng đậm; củ nhỏ; mô sẹo không đặc trưng
0,3	19,77 <sup>c</sup>	13,33 <sup>b</sup>	vảy vàng; củ nhỏ không đặc trưng; mô sẹo trắng.
0,6	26,89 <sup>b</sup>	14,57 <sup>b</sup>	vảy vàng sáng; củ không đặc trưng; mô sẹo vàng.
0,9	<b>42,37<sup>a</sup></b>	<b>26,89<sup>a</sup></b>	vảy vàng; củ nhỏ có chồi; có rễ; mô sẹo vàng mềm.
1,2	28,41 <sup>b</sup>	13,33 <sup>b</sup>	vảy vàng, củ trung có chồi; rễ dài; mô sẹo vàng cứng.
LSD <sub>0,05</sub>	3,41	1,24	
CV	7,3	4,5	

Ghi chú: các chữ cái a, b, c... trong cùng một cột biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa với  $\alpha = 0,05$ .

Từ kết quả bảng 7 ta thấy, tỷ lệ tạo mô sẹo và tạo củ cao hơn so với đối chứng ở môi trường MS và bổ sung từ 0,3 mg/l IBA đến 1,2 mg/l IBA. Khi tăng nồng độ IBA lên tới 1,2

mg/l, thì tỷ lệ mô sẹo giảm xuống còn 28,41% và tỷ lệ mẫu tạo củ cũng giảm còn 13,33%. Nồng độ IBA 0,9 mg/l có tỷ lệ tạo mô sẹo cao nhất (42,37%).



Hình 6. Vảy củ lily *L. poilanei* khi bổ sung nồng độ IBA khác nhau sau 8 tuần nuôi cấy

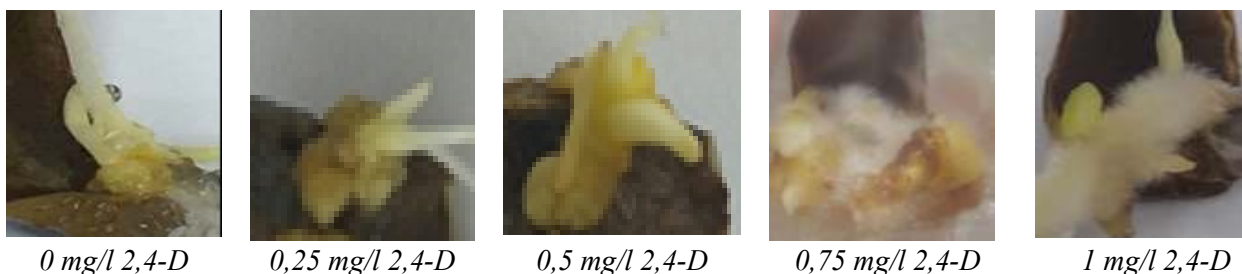
Theo kết quả nghiên cứu của Tạ Như Thực Anh và cộng sự (2007), cả ba loại auxin (2,4-D, IBA, NAA) đều có tác dụng kích thích hình thành mô sẹo. IBA còn khiến mô vảy củ hình thành mô sẹo và củ, 2,4-D thì thuộc nhóm auxin có tác dụng mạnh đến sự phát sinh hình thái mầm, đặc biệt kích thích hình thành mô sẹo (Machakova *et al.*, 2008). Do đó, trong thí nghiệm này, vảy củ được cấy vào môi trường MS có bổ sung nồng độ 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 mg/l 2,4-D. Sau 8 tuần nuôi cấy thu được kết quả ở bảng 8. Từ kết quả cho thấy, bổ sung 2,4

D vào môi trường MS nuôi cấy vảy củ Sapa, đều kích thích tạo ra củ con lily và mô sẹo. Cụ thể là, khi không bổ sung 2,4-D, tỷ lệ tạo mô sẹo chỉ là 6,94% và tỷ lệ mầm tạo củ 13,33%. Tỷ lệ tạo mô sẹo tăng dần từ 20% đến 66,67% khi bổ sung từ 0,25 mg/l 2,4-D đến 0,75 mg/l 2,4-D. Công thức thí nghiệm có bổ sung 0,75 mg/l 2,4-D cho tỷ lệ tạo mô sẹo cao nhất, đạt 66,67% mô sẹo vàng, mềm. Như vậy, ở môi trường bổ sung 0,25 mg/l 2,4-D, mầm phát sinh hình thái ra cả củ với tỷ lệ tạo củ cao nhất đạt 33,22%, và mô sẹo với tỉ lệ 26,89%.

Bảng 8. Ảnh hưởng của 2,4-D đến vảy củ *L. poilanei* sau 8 tuần nuôi cấy

2,4-D (mg/l)	Tỷ lệ mầm tạo mô sẹo (%)	Tỷ lệ mầm tạo củ (%)	Đặc điểm mẫu
0	6,94 <sup>e</sup>	13,33 <sup>d</sup>	củ nhỏ có chồi lá dài; mô sẹo nhỏ, không điển hình
0,25	20,00 <sup>d</sup>	33,22 <sup>a</sup>	củ nhỏ có chồi trung bình; sẹo nhỏ trắng, rất cứng
0,50	43,25 <sup>e</sup>	28,22 <sup>b</sup>	củ trung bình dài; mô sẹo vàng, cứng
0,75	66,67 <sup>a</sup>	20,00 <sup>c</sup>	củ nhỏ tròn; mô sẹo vàng, mềm, rễ tơ bao phủ
1,00	40,00 <sup>b</sup>	13,33 <sup>d</sup>	củ nhỏ nhọn; mô sẹo xốp, rễ tơ dài bao phủ
LSD <sub>0,05</sub>	0,6	5,7	
CV	0,39	2,30	

Ghi chú: Các chữ cái a, b, c... trong cùng một cột biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa  $\alpha = 0,05$ .



Hình 7. Vảy củ lily *L. poilanei* trong môi trường MS bổ sung 2,4-D sau 8 tuần nuôi cấy

Để nghiên cứu ảnh hưởng của BA kết hợp với 2,4D đến vảy củ lily, các vảy củ có kích thước dài khoảng 2 đến 3 cm và cấy vào môi trường MS và 0,3 mg/l BA có bổ

sung nồng độ 0; 0,25 ; 0,5 ; 0,75; 1; 1,25 mg/l 2,4 D. Sau 12 tuần nuôi cấy thu được kết quả ở bảng 9. Kết quả bảng 9 ta thấy, sau 12 tuần nuôi cấy, có sự sai khác có ý nghĩa về

tỉ lệ mẫu tạo củ, và tỉ lệ mẫu tạo mô sẹo ở các mẫu nuôi cấy trong các môi trường MS có 0,3 mg/l BA và bổ sung 2,4 D với hàm lượng khác nhau. Khi không bổ sung 2,4-D tỉ lệ tạo mô sẹo 8,33% nhưng tỉ lệ mẫu tạo củ cao nhất là 45%. Tỉ lệ tạo mô sẹo tăng dần từ 8,33% đến

41,67%, tỉ lệ tạo củ cũng giảm dần từ 45% xuống còn 16,67% khi bổ sung từ 0 mg/l 2,4-D đến 1,25 mg/l 2,4-D. Công thức tốt nhất ở thí nghiệm này là khi bổ sung 1 mg/l 2,4-D cho tỉ lệ tạo mô sẹo 43,33% mô sẹo khá to, khá mềm; tuy nhiên tỉ lệ tạo củ thấp giảm còn 25,00%.

**Bảng 9. Ảnh hưởng của BA và 2,4 D đến vảy củ *L.poilanei* sau 12 tuần nuôi cấy**

2,4D (mg/l)	Tỉ lệ mẫu tạo củ (%)	Tỉ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)	Đặc điểm mẫu
0	45,00 <sup>a</sup>	8,33 <sup>d</sup>	củ nhỏ, có chồi lá dài; mô sẹo không điển hình.
0,25	36,67 <sup>b</sup>	18,33 <sup>c</sup>	củ nhỏ; có chồi ngắn; mô sẹo không điển hình.
0,5	33,33 <sup>b</sup>	28,33 <sup>b</sup>	củ nhỏ, không chồi; mô sẹo không điển hình.
0,75	28,33 <sup>c</sup>	33,33 <sup>b</sup>	củ rất nhỏ; mô sẹo nhỏ, cứng.
1,00	25,00 <sup>c</sup>	43,33 <sup>a</sup>	củ rất nhỏ; mô sẹo to, khá mềm.
1,25	16,67 <sup>d</sup>	41,67 <sup>a</sup>	củ không đặc trưng; mô sẹo to, mềm.
CV (%)	4,39	5,16	
LSD <sub>0,05</sub>	7,8	9,8	

Ghi chú: Các chữ cái a, b, c... trong cùng một cột biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa  $\alpha = 0,05$ ; Môi trường nền: MS + 0,3 mg/l BA.

Tang *et al.* (2010) lại cho rằng, mô sẹo được hình thành tốt nhất từ vảy củ *Lilium Leucanthum* Baker khi được nuôi trên môi

trường MS có 0,5 mg/l BA và 1,0 từ 3,0 mg/l 2,4-D (với tỉ lệ 98,3%).



**Hình 8. Vảy củ *L.poilanei* trong môi trường MS bổ sung BA và 2,4 D**

Ghi chú

A: CT1 (0,3 mg/l BA + 0 mg/l 2,4D)

B: CT2 (0,3 mg/l BA + 0,25mg/l 2,4D)

C: CT3 (0,3 mg/l BA + 0,5 mg/l 2,4D)

D: CT4 (0,3 mg/l BA + 0,75mg/l 2,4D)

E: CT5 (0,3 mg/l BA + 1 mg/l 2,4D)

F: CT6 (0,3 mg/l BA + 1,25mg/l 2,4D)

Như vậy, dưới tác động của chất điều tiết sinh trưởng thực vật nghiên cứu, hầu hết các vảy củ đều tạo ra củ, giống như công bố của Maesato *et al.* (1994), ngoài ra, chúng còn tạo ra các phát sinh hình thái khác như chồi lá, mô sẹo, rễ.

#### 4. KẾT LUẬN

1. Sử dụng HgCl<sub>2</sub> 0,1% để khử trùng mẫu lá và vảy củ lily *L.poilanei* trong 5 phút cho tỉ lệ mẫu sống sạch tương ứng là 50% và 68,33%. Mẫu hoa chưa nở được khử bởi Javen 1,5%

trong 7 phút là thích hợp với tỉ lệ mẫu nhị và bầu nhụy sống sạch tương ứng là 51,11% và 73,33%.

2. Các mẫu lá *L.poilanei* nuôi cấy trong môi trường MS bổ sung 0 đến 2 mg/l 2,4D; các bầu nhụy nuôi cấy trong môi trường MS bổ sung từ 0 đến 1 mg/l BA; các mẫu nhị, và bao phấn *L.poilanei* được nuôi cấy trong môi trường MS bổ sung 1 - 4 mg/l Picloram nhưng không có phát sinh hình thái và chết (có màu vàng đen) sau 12 tuần nuôi cấy.



3. Vây củ *L.poilanei* nuôi cấy trên môi trường MS + 0,1 mg/l BA khiến 43,42% mẫu tạo chồi lá; trong môi trường MS + 0,3 mg/l BA khiến 39,42% mẫu tạo củ với hệ số tạo củ 0,46.

4. Môi trường MS có 0,5 mg/l NAA khiến 55,56% vây củ *L.poilanei* ra củ con, với hệ số nhân củ là 1,56. Môi trường MS có bổ sung IBA với nồng độ từ 0,3 đến 1,2 mg/l; 2,4 D từ 0,25 đến 1,0 mg/l kích thích vây củ *L.poilanei* tạo mô sẹo và củ con. Môi trường MS bổ sung 0,75 mg/l 2,4-D vào môi trường nuôi cấy vây củ *L.poilanei* đã kích thích quá trình tạo mô sẹo cao nhất, mô sẹo vàng sáng, mềm.

5. Môi trường MS bổ sung 0,3 mg/l BA và 1 mg/l 2,4 D là môi trường tối ưu tạo 25% mẫu vây củ *L.poilanei* tạo củ và 43,33% mẫu tạo mô sẹo to cứng.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Baranova M.V., 1996. The lily species in the flora of the former Soviet Union and their classification within the genus *Lilium*. *Acta Hort (ISHS)* 414:133-136.
2. Beattie D.J., White. J.W., 1993. *Lilium* hybrid and species. *Physiology of Flower Bulbs*. Elsevier Amsterdam, Netherlands, 423-454.
3. Bùi Thị Thu Hương & Trịnh Khắc Quang, 2013. Khả năng tạo củ lily *in vitro* của một số dòng lily nhập nội, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 3+4 :52-59.
4. Bui Thi Thu Huong, Dong Huy Gioi, Bui Van Thang, 2017. Optimisation of an *in vitro* propagation protocol for a valuable Lily (*Lilium* spp). *Journal of forestry science and technology*. Vol 5: 18-25.
5. Comber HF., 1949. A new classification of the genus *Lilium*. *Yearbook, Royal Hort Soc.* 13: 86-105.
6. De Jong P.C., 1974. Some notes on the evolution of lilies. *North American Yearbook*. 27. p.23-28.
7. Du L. J., Qi Y. Y., Liu, Y. L., Tian, F. F., Zhou, Q., & Wang, Y. J., 2014. Embryogenic cultures of lily (*Lilium* spp.): Optimizing callus initiation, maintenance, and plantlet regeneration. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 89(2), 159–166.
8. Geetika G., Surinder K., Shweta S., 2010. An Improved Regeneration System of Oriental Lily Hybrid from Ovary-Ovule Culture Using Plant Growth Regulator. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*. 4:92-95.
9. Grassotti A., Torrini F., Mercuri A. and Schiva T., 1990. Genetic improvement of *Lilium* in Italy. *Acta Horticulturae*. (ISHS) 266:339-348.
10. Grassotti A., 1996. Economic and culture techniques of *Lilium* production in Italy. *Acta Horticulturae*, 414 (1): 25-34.

11. Kim Y., 1996. Lily industry and research, and native *Lilium* species in Korea. *Acta Horticulturae*. 414:69-80.
12. Maesato K., Sharada K., Fukui H., Hara T. and Sarma K. S., 1994. *In vitro* bulblet regeneration from bulb scale explants of *Lilium japonicum* Thunb. Effect of plant growth regulators and culture environment. *Journal of Horticultural Science* (69): 289-297.
13. Mai Xuân Lương, 1993. Ứng dụng nuôi cấy mô trong nhân giống hoa huệ tây, nuôi cấy mô thực vật phục vụ công tác giống cây trồng, NXB Nông nghiệp, Hà Nội, trang 121-123.
14. Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473–497.
15. Nguyễn Thị Phương Thảo, Nông Thị Huệ, Vũ Quang Khánh, Nguyễn Hữu Cường, 2010. Nghiên cứu nhân nhanh invitro cây hoa loa kèn *Lilium poilanei* Gapnep. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 9 (5): 743 – 750.
16. Nguyễn Thị Phương Thảo, Vũ Quang Khánh, Cao Việt Anh, 2009. Đánh giá sự đa dạng hình thái và đặc điểm nông sinh học của cây lily bản địa *Lilium poilanei* Gagn. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 7 (4): 460 – 467.
17. Okubo H., 2014. History of *Lilium* species in Asia. *Acta Horticulturae* 1027: 11-26.
18. Stanilova M & Zagorska, 1993. Morphogenetic potential and *in vitro* micropropagation of endangered plant species *Leucojum aestivum* L. and *Lilium rhodopaeum* Delip. *Plant Cell Reports* 13 (8): 451 - 454.
19. Tạ Như Thục Anh, Nguyễn Trần Hy, Dương Thị Phúc Hậu, Ngô Quốc Luật, 2014. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng trong nhân giống *in vitro* cây đan sâm. *Tạp chí Dược liệu*, 9 (1): 57-64.
20. Takayama & Misawa, 1979. Differentiation in *Lilium* Bulbscales Grown *in vitro*. Effect of Various Cultural Conditions. *Physiologia Plantarum*, 46: 184–190.
21. Tang Y. P., Liu X. Q., Gituru R. W., & Chen L. Q., 2010. Callus Induction and Plant Regeneration from In Vitro Cultured Leaves, Petioles and Scales of *Lilium Leucanthum* Baker. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24(4), 2071–2076. <https://doi.org/10.2478/V10133-010-0077-4>
22. Yoshiji N. and Tsuyoshi O., 1979. *In vitro* bulblet formation from leaf segments of lilies, especially *Lilium rubellum* Baker. *Scientia Horticulturae* (11): 379-389.
23. Zhao X., Chen X., Li D. and Liu K., 1996. Resource and research situation of the genus *Lilium* in China. *Acta Horticulturae*. (ISHS) 414:59-68.
24. Vũ Hoài Sâm & Bùi Đức Huỳnh, 2016. Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Bách hợp (*Lilium Brownii* F.E. Brow)". *Tạp chí Công nghệ sinh học* 14(1): 121-129, 2016.

**RESEARCH ON EFFECTS OF SOME FACTORS  
ON SAPA LILY (*Lilium polaneii* Gapnep)  
USING TISSUE CULTURE TECHNOLOGY**

**Bui Thi Thu Huong<sup>1</sup>, Nguyen Thi Ngoc Huyen<sup>1</sup>, Nguyen Thi Huong<sup>1</sup>, Dong Huy Gioi<sup>1\*</sup>**  
<sup>1</sup>*Vietnam National University of Agriculture*

**SUMMARY**

Sapa Lily (*Lilium polaneii* Gapnep) is a rare flower in the world, with the long-lasting flower color and attractive fragrance. It is a very important genetic resource for lily breeding but has been being exploited seriously. Therefore, the study of *in vitro* morphogenesis of the lily tissues aims to propagate, conserve, and develop the *Lilium* genus. Samples of leaves and lily bulb scales were sterilized with HgCl<sub>2</sub> 0.1% for 5 minutes which resulted in the percentage of clean, survival samples of 50% and 68.33%. The unopened flower samples were treated by Javen (NaClO 1.5%) for 7 minutes, with the percentage of clean, survival figures of stamens, and ovary samples of 51.11% and 71.11%, respectively. The bulb scales were culture on MS medium with 0.1 mg/l BA caused 43.42% of the samples to produce leaf; in MS medium with 0.3 mg/l BA stimulated 39.42% of the samples to produce bulb scales with a coefficient of 0.46. The MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA was optimal for 55.56% of bulb scales reproduced bulblets, with a coefficient of 1.56. MS medium supplemented with IBA at 0.3 to 1.2 mg/l; 2,4-D from 0.25 to 1.0 mg/l promoted bulb scales to form callus and bulblets. The MS medium added 0.75mg/l 2,4-D was an ideal solution for callus formation with bright yellow and soft callus. In addition, MS medium supplemented with 0.5 mg/l BA and 1 mg/l 2,4-D also caused 25% of the bulb scales forming bulblets and 43.33% of the samples producing hard callus.

**Keywords:** *in vitro*, *Lilium polaneii*, morphogenesis, Sapa lily, tissue culture.

**Ngày nhận bài** : 21/8/2021  
**Ngày phản biện** : 25/9/2021  
**Ngày quyết định đăng** : 07/10/2021