Journal of Science of Lac Hong University
Special issue (11/2017), pp. 132-137

Tạp chí Khoa học Lạc Hồng
Số đặc biệt (11/2017), tr. 132-137

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* SEN TRẮNG HUẾ TỪ HẠT

In vitro propagation of Hue's white lotus from seeds

Hoàng Thị Kim Hồng[1], Trần Nguyễn Minh Hiếu[1], Phan Thế Nhật Minh[1], Nguyễn Hoàng Anh Thư[1], Nguyễn Thị Quỳnh Trang[2]

[1]hkhong@hueuni.edu.vn; [2]trangql2002@gmail.com
[1]Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế
[2]Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế
Đến tòa soạn: 21/07/2017; Chấp nhận đăng: 25/08/2017

Tóm tắt. Bài báo này trình bày các kết quả đạt được trong nhân giống *in vitro* sen trắng Huế, một loài sen bản địa mang thương hiệu của Huế. Hạt sen trưởng thành trồng ở hồ Tịnh Tâm, thuộc khu vực nội thành, thành phố Huế được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu trong nhân giống *in vitro*. Phần lõi bên trong hạt sen sau khi xử lý và khử trùng sơ bộ bằng cồn 70% trong 30 giây, rồi khử trùng tiếp với $HgCl_2$ 0,1% trong 6 phút, sau đó chuyển vào môi trường nuôi cấy cơ bản MS (Murashige Skoog), có bổ sung 6-benzylaminopurine (BAP) ở các nồng độ khác nhau từ 0,0-2,5 mg/l. Kết quả cho thấy trên môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/l BAP, mẫu nuôi cấy có khả năng tái sinh cụm chồi cao nhất (6,40 chồi/mẫu). Đỉnh chồi và đoạn thân thu được từ chồi *in vitro* được cấy lên môi trường nhân nhanh. Môi trường tối ưu cho quá trình nhân nhanh là môi trường MS có 10% nước dừa, bổ sung 1,5 mg/l BAP. Rễ được cảm ứng tốt nhất trên môi trường MS, bổ sung Naphthaleneacetic acid (NAA) 0,5 mg/l.

Từ khoá: *Đỉnh sinh trưởng; Hạt sen trắng; Môi trường MS; Nhân giống in vitro; Tái sinh chồi*

Abstract. This article presents the results of the *in vitro* propagation from seeds of Hue's white lotus, a famous Hue's local white lotus. White lotus's mature seeds collected from Tinh Tam Lake, Hue city, were used as initial materials for the *in vitro* propagation. The surface-sterilized seeds were sterilized by 70% ethanol for 30 seconds and then they were sterilized by $HgCl_2$ 0,1% for 6 min. The samples were cultured on MS (Murashige Skoog) medium supplemented with different concetrations of BAP from 0.0-2.5 mg/l for shoot regeneration. The results show that the MS medium supplemented with BAP 1.5 mg/l suitable for *in vitro* shoot regeneration. Shoot tips and nodal stem segments were multiple shoots micropropagation on MS medium supplemented with 10% fresh coconut, 1 g/l coal and 1,5 mg/l BAP. The highest number of shoots per explant were obtained on MS medium containing 1,5 mg/l BAP and 10% fresh coconut (6,4 shoots/ multiple shoots). Roots were formed well on MS medium supplemented 0,5 mg/l NAA (5,60 roots/shoot).

Keywords: *In vitro propagation; MS medium; Shoot tips; Shoot regeneration; White lotus's seeds*

1. GIỚI THIỆU

Cây sen là một loại thực vật thủy sinh đa niên có nguồn gốc từ Châu Á, xuất phát từ Ấn Độ [4], sau đó lan qua Trung Quốc, Nhật Bản, vùng Đông Bắc Châu Úc và nhiều nước khác. Cây sen có tên khoa học là *Nelumbo nucifera* Gaertn., thuộc họ Nelumbonaceae [9]. Ở Việt Nam, sen được trồng khá phổ biến suốt từ Bắc vào Nam trong các ao, hồ, đầm, ruộng sâu nhiều bùn, thậm chí có thể sinh trưởng, phát triển tốt ngay cả trong điều kiện đất trũng, nước ngập sâu mà các cây trồng khác không thể tồn tại được [7]. Cây sen là loại thực vật có thể trồng để lấy hoa, lấy hạt hoặc lấy củ đồng thời tất cả các bộ phận của cây sen từ hoa, lá cho đến ngó, gương, hạt…đều có thể được sử dụng làm món ăn và vị thuốc có giá trị trong y học cổ truyền [8]. Hoa sen được nấu uống trị bệnh tim, hạ huyết áp [3] và đây là một loại cây dễ trồng đồng thời có khả năng sinh trưởng, phát triển tốt trên môi trường thủy sinh [1]. Ngoài ra, trong cây sen còn chứa một loạt các hợp chất thứ cấp quan trọng như alkaloid, flavonoid, steroid, triterpenoid, glycoside và polyphenol có hoạt tính chống oxy hóa cực mạnh có tác dụng trong việc cải thiện sức khỏe của con người [6]. Cây sen thường sinh sản vô tính bằng hình thức nảy mầm từ hạt hoặc phát triển từ thân rễ [2], ngoài ra cây sen còn được nhân giống bằng hình thức nuôi cấy mô tế bào [10].

Riêng ở Huế, cây sen còn gắn liền với hình ảnh của nhiều thắng cảnh nổi tiếng như Đại Nội, lăng tẩm và chùa chiền… Người Huế dùng hoa sen Huế như một biểu tượng của Phật giáo để chưng cúng ở những nơi trang nghiêm nhất. Ngoài ra, sen Huế thường được sử dụng như là một điểm nhấn trong trang trí và trưng bày ở các dịp lễ hội Festival hay lễ hội Làng nghề truyền thống, đặc biệt hình tượng sen Huế còn được thiết kế và thả nổi trên dòng sông Hương trong các dịp tổ chức sự kiện lớn ở Huế. Trong số các giống sen ở Thừa Thiên Huế thì giống sen trắng (chủ yếu là giống sen trắng trẹt dĩa), một giống sen bản địa mang thương hiệu đặc trưng với mùi vị thơm ngon, ngọt, bùi và dẻo. Thông qua quá trình khảo sát và tìm hiểu người dân trồng sen lâu năm ở Huế thì sen trắng có các giống khác nhau như sen trắng trẹt dĩa trắng bộp và trắng mặt nhăn [3]. Về hình thái đặc trưng có thể phân biệt sơ bộ qua đặc điểm cuả hoa và gương của các giống sen này như sau: (1) Giống sen trắng trẹt dĩa lồi: nụ hoa ngắn và bầu, mặt gương cong và lồi ra phía trước, hạt nhỏ nhưng nhiều. (2) Giống sen trắng trẹt dĩa lõm: nụ hoa nhọn và dài, gương phẳng hoặc lõm, hạt nhỏ nhưng nhiều hạt. (3) Giống sen trắng bộp: nụ hoa nhọn và dài nhưng ở cánh hoa, cách đầu cánh hoa khoảng 2 cm có lõm có dạng vòng cung, hạt ít nhưng to, số lượng hoa ít, lá to kích thước tối đa có thể lên đến trên 80 cm. (4) Giống sen trắng mặt nhăn: nụ hoa ngắn, bề mặt gương sen có nếp nhăn [3]. Hiện nay, giống sen trắng bộp và sen trắng mặt nhăn đã dần mất giống và hầu như không còn xuất hiện ở Huế [3]. Riêng sen trắng trẹt dĩa - giống sen trắng đặc trưng của Huế, có hoa màu trắng và bầu (Hình 1B và 1B), mặt gương phẳng và hạt hơi lồi ra phía trước (Hình 1C), hạt nhỏ nhưng nhiều (Hình 1D), thì vẫn còn tồn tại rải rác ở một số hồ thuộc khu vực nội thành, thành phố Huế, nhưng chúng đang có xu hướng dần khan hiếm về nguồn giống. Nguyên nhân là do sự cạnh tranh của các giống sen cao sản được du nhập từ các vùng miền khác vào trồng ở Huế, cũng như sự ô

nhiễm của các sông hồ trong những năm gần đây đã dần dần thu hẹp diện tích trồng sen trắng Huế. Hiện nay, người trồng sen ở Huế chủ yếu sử dụng các giống sen hồng cao sản cho năng suất cao hơn để trồng và rất ít hộ dân trồng sen trắng Huế, vì thế các giống sen trắng gốc Huế đang ngày càng suy giảm về số lượng, diện tích trồng và có xu hướng mất dần giống gốc.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày một số kết quả bước đầu trong nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây sen trắng Huế từ hạt, làm cơ sở cho việc nhân nhanh loài cây này để phục vụ cho công tác bảo tồn các giống sen Huế cho các khu di tích đồng thời cung cấp cây giống *invitro* để đưa vào sản xuất và phát triển giống sen này ở Huế.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

Nguyên liệu là hạt giống sen trắng Huế (giống sen trắng trẹt dĩa có nguồn gốc ở Huế) được thu mẫu tại hồ Tịnh Tâm, thuộc khu vực nội thành, thành phố Huế.

Hình 1. *(A) Hình thái của giống sen trắng Huế ở hồ Tịnh Tâm; (B) hình thái hoa nở; (C) đài hoa; (D) hạt sen trắng Huế*

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Chuẩn bị mẫu, khử trùng và nuôi cấy khởi đầu

Các hạt sen được bóc bỏ lớp vỏ cứng bên ngoài thu lấy phần hạt sen bên trong. Sau đó rửa mẫu bằng xà phòng loãng 3 lần mỗi lần 10 phút, tiếp theo rửa dưới vòi nước chảy cho sạch rồi lặp lại 3 lần trước khi rửa lại bằng nước cất vô trùng và cho vào chai thủy tinh Duran,vặn chặt nắp chai trước khi đem vào phòng cấy để tiếp tục khử trùng. Trong tủ cấy, mẫu được lắc bằng nước cất vô trùng 3 lần, mỗi lần 5 phút. Sau đó, mẫu được khử trùng sơ bộ bằng cồn 70% trong 30 giây. Tiếp tục khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% từ 4-15 phút để xác định thời gian khử trùng mẫu thích hợp. Mẫu được rửa sạch lại bằng nước cất vô trùng 4-5 lần trước khi cấy vào môi trường dinh dưỡng MS [5] cơ bản có 8 g/l agar, 30 g/l sucrose để đánh giá khả năng khử trùng và tái sinh chồi sau 4 tuần nuôi cấy.

2.2.2 Nghiên cứu tái sinh chồi

Đoạn thân và đỉnh sinh trưởng (0,5-1,0 cm) thu được từ chồi *in vitro* trong nuôi cấy ban đầu được cấy lên môi trường MS cơ bản bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar và BAP ở nồng độ khác nhau trong khoảng 0,0-2,5 mg/l để tiếp tục nuôi cấy và thăm dò khả năng tái sinh chồi của chúng. Số liệu nghiên cứu được đánh giá sau 4 tuần nuôi cấy.

2.2.3 Nghiên cứu nhân chồi

Đoạn thân và đỉnh sinh trưởng của chồi *in vitro* sẽ được tách thành những mảnh nhỏ và chuyển lên môi trường MS có chứa 8 g/l agar, 30 g/l sucrose, 10% nước dừa và bổ sung riêng lẻ BAP (0,0-2,0 mg/l), hoặc kết hợp giữa BAP với NAA để thăm dò khả năng nhân chồi. Số liệu thu được sau 5 tuần nuôi cấy. Chu kỳ cấy chuyền 5 tuần/lần để nhân được lượng chồi cần thiết đủ để làm nguồn nguyên liệu phục vụ cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.4 Tạo rễ

Các cụm chồi *in vitro* thu được từ giai đoạn nhân chồi sẽ được tách thành từng chồi đơn và chuyển lên môi trường cơ bản MS có chứa 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 0,5 g/l than hoạt tính, bổ sung NAA (0,0-1,0 mg/l) để thăm dò khả năng tạo rễ và phát triển thành cây con *in vitro* hoàn chỉnh. Số liệu nghiên cứu thu thập sau 4 tuần nuôi cấy.

Tất cả các môi trường nuôi cấy trong các giai đoạn nhân giống *in vitro* được điều chỉnh để có pH 5,8 và được khử trùng ở 121^oC, 1 atm trong 15 phút. Các thí nghiệm được bố trí trong phòng nuôi cấy vô trùng, duy trì nhiệt độ 25 ± 2^oC, cường độ ánh sáng khoảng 2.000 lux và thời gian chiếu sáng là 10-12 giờ/ngày.

2.2.5 Xử lý thống kê

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu thực nghiệm được tính giá trị trung bình và phân tích ANOVA (Duncan'test, $p<0,05$) bằng chương trình SAS.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thăm dò điều kiện khử trùng

Trong quá trình thăm dò ban đầu, chúng tôi khử trùng mẫu với $HgCl_2$ 0,1% trong các khoảng thời gian thay đổi khác nhau: 4 phút, 6 phút, 8 phút hoặc15 phút và tiến hành theo qui trình như đã trình bày ở phần "Vật liệu và phương pháp nghiên cứu".

Hình 2. *Mẫu sau khi khử trùng được cấy lên môi trường MS có 8 g/l agar, 30 g/l sucrose để theo dõi tỷ lệ mẫu nhiễm, tỷ lệ mẫu không nhiễm và sống sót trên môi trường nuôi cấy ban đầu, trong đó tỷ lệ mẫu nhiễm được tính dựa trên % số mẫu không bị nhiễm so với số mẫu được cấy ban đầu.*

Mẫu được rửa sạch lại bằng nước cất vô trùng 4 - 5 lần trước khi cấy vào môi trường nuôi cấy ban đầu là môi trường dinh dưỡng cơ bản MS có 8 g/l agar, 30 g/l sucrose để đánh giá khả năng khử trùng và tái sinh chồi *in vitro* (Hình 2).

Kết quả nghiên cứu thăm dò điều kiện khử trùng tối ưu trong nhân giống *in vitro* hạt sen trắng được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. *Ảnh hưởng của thời gian khử trùng mẫu bằng $HgCl_2$ 0,1%*

Thời gian khử trùng bằng $HgCl_2$ (phút)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)
15	0,00	62,00	48,00
8	0,00	26,50	73,50
6	0,00	25,00	75,00
4	4,00	22,33	73,67

Kết quả trình bày ở Bảng 1 cho thấy, thời gian khử trùng bằng dung dịch $HgCl_2$ 0,1% ảnh hưởng lớn đến khả năng nhiễm và tỷ lệ sống sót cuả hạt. Khi mẫu nuôi cấy được khử trùng bằng dung dịch $HgCl_2$ 0,1% với thời gian thay đổi từ 4 - 15 phút thì tỷ lệ mẫu sống, mẫu nhiễm và mẫu không nhiễm thay đổi khác nhau. Khử trùng mẫu với $HgCl_2$ 0,1% trong thời gian 4 phút rồi chuyển mẫu lên môi trường cơ bản MS có 8 g/l agar, 30 g/l sucrose trong nuôi cấy ban đầu, sau 4 tuần nuôi cấy, quan sát thấy có 4,00% mẫu bị nhiễm, 22,33% mẫu bị chết và 73,67% mẫu sống (Bảng 1). Khi tăng thời gian khử trùng lên 6 phút, 8 phút hoặc15 phút thì tất cả mẫu nuôi cấy đều không bị nhiễm, tuy nhiên số lượng mẫu bị chết và mẫu sống thay đổi khác nhau. Khử trùng mẫu với $HgCl_2$ 0,1% trong thời gian 15 phút có 48,00% mẫu sống không nhiễm, nhưng tỉ lệ mẫu chết khá cao chiếm 62,00% lượng mẫu được nuôi cấy.

Nhìn chung, so với các thời điểm thăm dò khác, thì việc khử trùng mẫu bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 6 phút cho kết quả tốt nhất. Hầu hết các mẫu nuôi cấy không bị nhiễm, tỷ lệ mẫu chết giảm mạnh đạt 25,00% và tỷ lệ mẫu sống tăng lên đạt 75,00%. Hầu hết các mẫu sen sống sót trong môi trường nuôi cấy ban đầu trong điều kiện khử trùng này đều có khả năng tái sinh chồi và các chồi *in vitro* tái sinh có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt (Hình 3), do vậy chúng tôi sử dụng các chồi *in vitro* trên môi trường này làm nguyên liệu trong thí nghiệm tái sinh cụm chồi và triển khai các thí nghiệm tiếp theo.

Hình 3*. Mẫu nuôi cấy tái sinh chồi in vitro, chồi có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt*

Từ kết quả nêu trên, chúng tôi kết luận khử trùng mẫu nuôi cấy với cồn 70% trong 30 giây và khử trùng tiếp với $HgCl_2$ 0,1% trong 6 phút là bước khử trùng thích hợp trong nhân giống *in vitro* sen trắng Huế từ hạt.

3.2 Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tái sinh chồi và cụm chồi *in vitro*

Chồi *in vitro* của các mẫu sen sống sót và phát triển sau 4 tuần trong môi trường nuôi cấy ban đầu, được tách ra khỏi môi trường nuôi cấy, cắt bỏ phần lá bên trên và tỉa gọn phần gốc bên dưới để có kích thước khoảng 0,5-1,0 cm, sau đó chuyển mẫu sang môi trường MS có 30 g/l sucrose, 8 g/l agar và bổ sung BAP ở nồng độ khác nhau trong khoảng 0,0-2,5 mg/l để tiếp tục nuôi cấy và thăm dò khả năng tái sinh chồi và cụm chồi của chúng.

Sau 4 tuần nuôi cấy, chúng tôi nhận thấy mẫu nuôi cấy trên môi trường cơ bản MS có khả năng cảm ứng tái sinh chồi khá tốt, một số mẫu còn có khả năng tạo cụm chồi nhưng số chồi trên mỗi cụm còn rất ít. Trên môi trường MS có bổ sung BAP ở các nồng độ thay đổi từ 0,0-2,5 mg/l, hầu hết mẫu nuôi cấy tái sinh chồi (Bảng 2), ngoại trừ các mẫu nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/l BAP là có khả năng tạo chồi tốt nhất, đồng thời một số mẫu trong môi trường này còn có khả năng tạo cụm chồi với số chồi cao nhất từ 4-5 chồi trên một cụm chồi (Bảng 2, Hình 4).

Bảng 2. *Khả năng tái sinh chồi và cụm chồi trên môi trương MS có bổ sung BAP*

Môi trường MS bổ sung BAP (mg/l)	Tạo chồi	Tạo cụm chồi
0.0	++++	+
0.5	++	-
1.0	+++	-
1.5	+++++	++
2.0	++	-
2.5	+	-

Chú thích: Các ký hiệu trong bảng biểu thị khả năng tạo chồi hoặc cụm chồi tăng dần tương ứng theo các mức '-: không tạo cụm chồi, +: tạo chồi hoặc cụm chồi yếu, ++: tạo chồi hoặc cụm chồi trung bình, +++: tạo chồi khá, ++++: tạo chồi tốt, và +++++: tạo chồi rất tốt.

Hình 4. *Cụm chồi hình thành trên môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/l BAP*

Theo dõi sự tăng trưởng của các chồi *in vitro* được tái sinh trên môi trường MS có bổ sung BAP, chúng tôi nhận thấy các mẫu chồi *in vitro* tái sinh có chiều cao thay đổi dần qua từng tuần nghiên cứu, trong đó chiều cao chồi dao động từ 1,94-3,27 cm ở tuần thứ nhất và tăng lên trong khoảng từ 2,93-7,12 cm ở tuần thứ 4 (Bảng 3).

Kết quả ở (Bảng 3) cho thấy những mẫu được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/l BAP có chiều cao chồi tốt nhất, đạt giá trị cao nhất vào tuần thứ 4 là 7,12 cm (Bảng 3).

Bảng 3. *Ảnh hưởng của BAP đến chiều cao (cm) của chồi in vitro theo thời gian*

BAP (mg/L)	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4
0.0	2,29^{a}	3,21^{b}	5,75^{c}	6,41^{d}
0.5	1,94^{a}	2,46^{ab}	3,25^{b}	3,87^{bc}
1.0	3,09^{b}	3,77^{bc}	4,26^{bc}	4,61^{bc}
1.5	3,27^{b}	4,03^{bc}	5,87^{c}	7,12^{e}
2.0	2,08^{a}	2,52^{a}	2,71^{ab}	2,93^{b}
2.5	2,21^{a}	3,12^{b}	3,34^{b}	3,77^{bc}

Chú thích: các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với p<0,05 (Duncan's test). Chú thích này sẽ được sử dụng thống nhất cho tất cả các bảng có xử lý sai số còn lại và sẽ không được chú thích lại trong các bảng tiếp theo.

3.3 Kết quả nhân chồi

3.3.1 Nhân chồi trên môi trường bổ sung riêng lẽ BAP

Khi nghiên cứu khả năng nhân chồi trên môi trường MS có chứa 8 g/l agar, 30 g/l sucrose, 10% nước dừa và bổ sung riêng lẻ BAP (0,0-1,5 mg/l) sau 5 tuần nuôi cấy thu được kết quả trình bày ở bảng 4. Kết quả từ bảng 4 cho thấy trên môi trường MS không bổ sung BAP, than hoạt tính và nước dừa thì hầu hết các mẫu nuôi cấy đều có khả năng nhân chồi kém (1 chồi/mẫu) và sự tăng trưởng chiều cao của chồi cũng thấp (2,30 cm). Trên môi trường MS chứa 8 g/l agar, 30 g/l sucrose, có bổ sung BAP, nhưng không có than hoạt tính và nước dừa, khả năng nhân chồi và chiều cao của chồi có tăng nhưng không đáng kể. Trên các môi trường này, số chồi cao nhất đạt 2 chồi/cụm và chiều cao lớn nhất của chồi đạt 3,68 cm. Việc bổ sung than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy MS có BAP, không có khả năng cải thiện hệ số nhân chồi và chiều cao của chồi (Bảng 4).

Bảng 4. *Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân chồi*

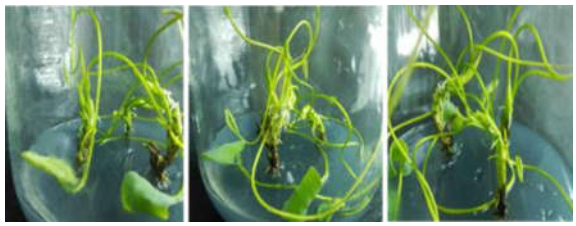
Nồng độ BAP (mg/l)	Than hoạttính (1g/l)	Nước dừa (10%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
0,0	-	-	1,00^{d}	2,30^{cd}
1,0	-	-	2,00^{bc}	3,68^{bc}
1,5	-	-	1,56^{cd}	2,28^{cd}
1,0	+	-	1,50^{cd}	2,54^{cd}
1,5	+	-	1,70^{bcd}	2,07^{d}
1,0	-	+	2,40^{bc}	3.3^{bcd}
1,5	-	+	6,40^{a}	5,41^{bcd}
1,0	+	+	2,50^{b}	6,63^{a}
1,5	+	+	1,55^{cd}	4,08^{b}

Chú thích: - Ký hiệu: dấu -: không bổ sung, dấu +: có bổ sung

Tuy nhiên, khi mẫu được nuôi cấy trên môi trường MS có chứa 8 g/l agar, 30 g/l sucrose, 10% nước dừa, bổ sung 1,0 hoặc 1,5 mg/l BAP cho kết quả nhân chồi tốt (2,50 chồi/mẫu) và chiều cao của chồi cũng tăng cao đạt 6,63 cm. Tăng nồng độ BAP từ 1,0 mg/l đến 1,5 mg/l, không bổ sung than hoạt tính và nước dừa cho kết quả nhân nhanh tạo cụm chồi thấp (1,56 chồi/mẫu) và sự tăng trưởng chiều cao của chồi giảm, đạt 2,28 cm. Ngoài ra khi thăm dò mẫu nuôi cấy trên môi trường MS có chứa 8 g/l agar, 30 g/l sucrose, 10% nước dừa, 1 gam than hoạt và bổ sung 1,0 mg/l BAP sẽ kích thích chồi tăng trưởng về chiều cao tốt nhất, nhưng tỉ lệ tạo cụm chồi lại thấp (Bảng 4, Hình 5A). Trong khi đó mẫu nuôi cấy trên môi trường MS có chứa 8 g/l agar, 30 g/l sucrose, 10% nước dừa, bổ sung 1,5 mg/l BAP cho kết quả nhân chồi tốt nhất, trung bình đạt 6,40 chồi/mẫu nhưng chiều cao của mẫu thì thấp, chiều cao trung bình của chồi đạt 5,41 cm (Bảng 4). Mẫu điển hình sau 5 tuần nuôi cấy trên môi trường này tạo cụm chồi có 7 chồi con với 13 lá (Hình 5B).

Hình 5. *Hình thái cụm chồi phát sinh trong giai đoạn nhân nhanh: (A) trên môi trường MS có, 1gam than hoạt tính, 10% nước dừa và bổ sung 1,0 mg/l BAP; (B) trên môi trường MS có 10% nước dừa và bổ sung 1,5 mg/l BAP sau 5 tuần nuôi cấy*

Khi tiếp tục cấy chuyển mẫu trên môi trường nhân chồi MS có chứa 8 g/l agar, 30 g/l sucrose, 10% nước dừa, 1 gam than hoạt tính và bổ sung 1,0 mg/l BAP, sau 5 tuần nuôi cấy, quan sát thấy một số mẫu còn có khả năng tạo rễ nhỏ trên thân và thân dài, mang nhiều đốt chồi, chồi và lá sinh trưởng, phát triển tốt hơn so với mẫu trồng trên các môi trường khác (Hình 6).



Hình 6. *Hình ảnh cụm chồi sinh trưởng, phát triển tốt và hình thành rễ con trên môi trường nhân nhanh MS có 1 gam than hoạt tính, 10% nước dừa và bổ sung 1,0 mg/l BAP sau 5 tuần nuôi cấy*

3.3.2 Nhân chồi trên môi trường bổ sung BAP phối hợp với NAA

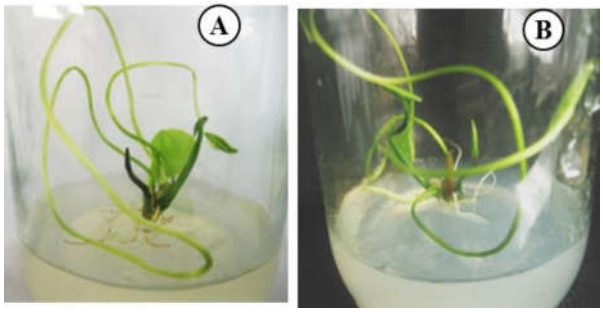
Trong nghiên cứu này chúng tôi cũng thăm dò ảnh hưởng của BAP phối hợp với NAA đến khả năng nhân chồi bằng cách chuyển các chồi đơn *in vitro* lên môi trường MS, có 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 10% nước dừa, bổ sung 1,5 mg/l BAP kết hợp với NAA (0,5-1,5 mg/l) để thăm dò khả năng nhân chồi. Kết quả sau 4 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 5 và hình 7.

Bảng 5. *Ảnh hưởng của BAP phối hợp với NAA lên khả năng nhân chồi*

BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Số chồi/mẫu	Chiều dài chồi (cm)	Tỷ lệ tạo rễ (%)
1,5	0,25	1,32^{a}	6,38^{a}	46,67
1,5	0,50	1,61^{b}	8,69^{b}	53,33
1,5	1,00	0,82^{c}	7,13^{c}	36,67

Từ kết quả ở Bảng 5 cho thấy việc bổ sung 1,5 mg/l BAP kết hợp với NAA ở các nồng độ 0,25; 0,50 và 1,00 mg/l trong môi trường nhân chồi có ảnh hưởng đến khả năng nhân chồi của mẫu nuôi cấy thông qua các chỉ tiêu như số chồi tạo thành và chiều dài chồi trong đó giá trị trung bình cao nhất của số chồi tạo thành (1,61 chồi/mẫu), chiều dài chồi (8,69 cm) và

nhiều mẫu có khả năng tạo rễ với tỉ lệ trung bình tạo rễ cao nhất (53,33%) đạt được khi mẫu chồi *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường MS có 10% nước dừa và bổ sung 1,5 mg/l BAP kết hợp với 0,5 mg/l NAA.



Hình 7. *Mẫu nuôi cấy sinh trưởng, phát triển và tạo rễ trên môi trường MS có 10% nước dừa, bổ sung (A) 1,5 mg/l BAP kết hợp với 0,5 mg/l NAA và (B) 1,5 mg/l BAP kết hợp với 1,0 mg/l NAA*

Điều đáng lưu ý là các mẫu nuôi cấy trên môi trường nhân chồi, có bổ sung phối hợp BAP với NAA, ngoài khả năng tạo rễ, chúng thường có hệ số nhân chồi thấp nhưng chúng lại có khả năng sinh trưởng, phát triển tốt, tạo các chồi có chiều cao lớn hơn nhiều so với các mẫu nuôi cấy trên môi trường chỉ bổ sung riêng lẻ BAP ((Hình 7, Bảng 5). Điều này có thể là do NAA là chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm auxin nên chúng có khả năng kích thích chồi phát triển tạo rễ, đồng thời BAP là chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin nên khi phối hợp chung với nhóm auxin (NAA) có khả năng kích thích chồi phát triển tăng chiều cao.

3.4 Tạo rễ

Chồi đơn *in vitro* được tách từ các cụm chồi sẽ được chuyển lên môi trường tạo rễ, là môi trường MS, có 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 0,5 g/l than hoạt tính, bổ sung NAA ở các nồng độ khác nhau từ 0,0-1,0 mg/l để thăm dò khả năng tạo rễ và phát triển thành cây con *in vitro* hoàn chỉnh. Kết quả thu sau 4 tuần nuôi cấy được trình bày ở Bảng 6.

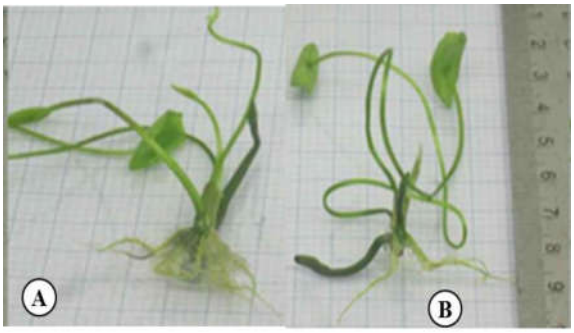
Bảng 6. *Ảnh hưởng của NAA đến khả năng tạo rễ*

NAA (mg/l)	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ tạo rễ (%)
0,00	0,73^{a}	1,25^{a}	21,11
0,25	1,42^{b}	1,48^{b}	33,33
0,50	5,60^{c}	2,67^{c}	62,22
0,75	2,65^{bc}	2,51^{c}	31,11
1,00	2,50^{bc}	2,58^{c}	20,00

Kết quả ở Bảng 6 cho thấy trên môi trường tạo rễ, không bổ sung NAA, tỷ lệ tạo rễ thấp (21,11%). Khi tăng nồng độ NAA trong môi trường nuôi cấy lên 0,5 mg/l, tỷ lệ tạo rễ tăng mạnh (62,22%) , số rễ/ mẫu cũng đạt được kết quả cao nhất (5,60). Nhưng nếu tăng nồng độ NAA lên 1,0 mg/l thì tỷ lệ tạo rễ cũng như số rễ/mẫu giảm xuống chỉ còn tương ứng là 20,00% ở tỷ lệ tạo rễ và 2,50 số rễ/mẫu. Kết quả thu được ở bảng 5 cho thấy mẫu nuôi cấy trên môi trường tạo rễ có bổ sung 0,5 mg/l NAA thích hợp cho quá trình tạo rễ trong nhân giống *in vitro* sen trắng Huế từ hạt.

Có thể quan sát một số hình ảnh tạo rễ của mô nuôi cấy trên môi trường này ở Hình 8.

Từ các kết quả thu được từ Bảng 6 và Hình 8 có thể kết luận rằng môi trường MS, có 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 0,5 g/l than hoạt tính, bổ sung 0,5 mg/l NAA thích hợp cho quá trình tạo rễ trong nhân giống *in vitro* sen trắng Huế.



Hình 8. *Mẫu nuôi cấy tạo rễ trên môi trường MS có bổ sung (A) 0,5 mg/l NAA và (B) 1,0 mg/l NAA*

4. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu này, chúng tôi rút ra một số kết luận sau: (1) Mẫu nuôi cấy sau khi được khử trùng sơ bộ bằng cồn 70% trong 30 giây và khử trùng tiếp bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 6 phút có khả năng sống sót, sinh trưởng và phát triển tốt trên môi trường nuôi cấy ban đầu. (2) Môi trường MS có 30 g/l sucrose, 8 g/l agar và bổ sung 1,5 mg/l BAP thích hợp cho mẫu nuôi cấy tái sinh chồi *in vitro*. (3) Môi trường MS có 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 10% nước dừa và bổ sung 1,5 mg/l BAP thích nghi cho quá trình nhân nhanh và tạo cụm chồi *in vitro*. (4) Môi trường cơ bản MS có 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 0,5 g/l than hoạt tính, bổ sung 0,5 mg/l NAA thích hợp cho mẫu nuôi cấy tạo rễ và phát triển thành cây con *in vitro* hoàn chỉnh.

5. CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi nguồn kinh phí của đề tài cấp Tỉnh năm 2017-2018 do Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Thừa Thiên Huế tài trợ.

6. TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Hicks D.J., "Development and evaluation of a system for the study of mineral nutrition of sacred lotus (*Nelumbo nucifera*)", Thesis of Doctor of Phylosoph, Centre for Horticulture and Plant Sciences, University of Western Sydney, Hawkesbury, Australia, pp. 65-72, 2005.

[2] Ken T., "The Auburn University Lotus Project. Cultivation of Lotus (*Nelumbo nucifera* and *Nelumbo lutea*)", Advances in Soil and Fertility Management, International Waterlily and Water Gardening Society's Water Garden Journal 4th Quarter, 24 (4), pp. 7-8, 2009.

[3] Lê Công Sơn, "Bảo tồn, lưu trữ giống sen trắng phục vụ tôn tạo cảnh quan cho hồ Thái Dịch khu vực Đại Nội Huế. Báo cáo tổng kết đề án nghiên cứu khoa học", Trung tâm bảo tồn di tích cố đô Huế, pp. 45-52, 2008.

[4] Ling Z.Q., Xie B.J., Yang E.L., "Isolation, characterization and determination of antioxidative activity of oligomeric procyanidins from the Seedpod of *Nelumbo nucifera* Gaernt", Journal of Agriculture Food Chemistry, 53 (7), pp. 2441-2445, 2005.

[5] Murashige T., Skoog F., "A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures", Physiology Plant 15, pp. 473-497, 1962.

[6] Pulok K. M., Kakali S., Saha B. P., Das J., "Diuretic Activity of Extract of the Rhizomes of *Nelumbo nucifera* Gaertn. (Fam. Nymphaeaceae)", Phytotheraphy Research, 10, pp. 424 – 425, 1996.

[7] Sandip G., Sheetal S., "*Nelumbo nucifera* the phytochemical profile and traditional uses", Pharma Science Monitor. 5(3), pp.1-12, 2014.

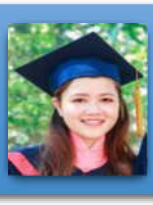
[8] Shou S.Y., Miao L.X., Zai W.S., Huang X.Z., Guo D.P., "Factors influencing shoot multiplication of lotus (*Nelumbo nucifera*)", Biologia Plantarum, 52(3), pp. 529-532, 2008.
[9] Sridhar K.R., Bhat R., "Lotus - A potential nutraceutical source", Journal of Agricultural Technology, 3(1), pp. 143-155, 2007.
[10] Xia Y., Jiajing S., Zhao L., Diao Y., Zheng X., Xie K., Hu M.Z.Z., "*In vitro* plant regeneration of Lotus (*Nelumbo nucifera*)", Open Life Sciences, 10, pp. 142-146, 2015.

TIỂU SỬ TÁC GIẢ

Hoàng Thị Kim Hồng

Sinh năm 1966 tại Huế. Tiến sĩ chuyên ngành Công nghệ sinh học tại Trường Đại học Kagoshima, Nhật Bản năm 2005. Sau tiến sĩ tại Nhật Bản (JSPS, Saga University) năm 2006-2008, tại Áo (Boku University) năm 2009, tại Mỹ (University of Reno, Nevada) năm 2011 và 2013, tại Bỉ (Vrije University, Belgium, VUB) năm 2012 và 2014. Đạt danh hiệu PGS năm 2012. Hiện cô đang là giảng viên cao cấp kiêm phó bộ môn Sinh học ứng dụng, khoa Sinh học trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

Email: hkhong@hueuini.edu.vn



Trần Nguyễn Minh Hiếu

Sinh ngày 25/08/1994 tại Thừa Thiên Huế. Tốt nghiệp kỹ sư Công nghệ Sinh học tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế năm 2017. Thực tập sinh tại Viện Hàn Lâm Sinica tại Đài Loan 2017.Lĩnh vực nghiên cứu: Sinh học thực vật và sinh học phân tử. Nuôi cấy mô tế bào thực vật.

Email: minhhieutrannguyen94@gmail.com

Phan Thế Nhật Minh

Sinh ngày 25/09/1994 tại Thừa Thiên Huế. Tốt nghiệp kỹ sư ngành Công nghệ sinh học tại trường Đại học Khoa học, Đại học Huế năm 2017. Lĩnh vực nghiên cứu: Sinh học thực vật và sinh học phân tử. Nuôi cấy mô tế bào thực vật.

Email: phanthenhatminh@gmail.com

Nguyễn Thị Quỳnh Trang

Sinh ngày 12/07/1983 tại Nghệ An. Tốt nghiệp Thạc sĩ chuyên ngành Sinh học thực nghiệm - tại Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Từ năm 2006 đến nay, là giảng viên tại Khoa Sinh học, Đại học Sư phạm, Đại học Huế. Lĩnh vực nghiên cứu: Sinh lý thực vật, có trên 5 bài báo và báo cáo khoa học đăng tải trên các tạp chí chuyên ngành và hội nghị trong nước.

Email: trangql2002@gmail.com

Nguyễn Hoàng Anh Thư

Sinh năm 1993 tại Quảng Trị. Tốt nghiệp cử nhân Công nghệ Sinh học tại trường Đại học Đà Lạt. Hiện nay là học viên cao học ngành Công nghệ sinh học thuộc khoa Sinh học, trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Lĩnh vực nghiên cứu: Sinh học phân tử. Nuôi cấy mô tế bào thực vật.