

Ảnh hưởng của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong sự hình thành rễ bất định ở hồng tâm xuân và hồng nhung

Effect of plant growth regulators on adventitious rooting of *Rosa canina* L. and *Rosa hybrida* L.

Huỳnh Thị Xuân Quỳnh^{*}, Trần Thanh Hương¹, Bùi Trang Việt¹

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

^{*}Tác giả liên hệ, Email: htxquynh@hcmus.edu.vn

THÔNG TIN

TÓM TẮT

DOI:10.46223/HCMCOUJS.tech.vi.13.1.798.2018

Ngày nhận: 21/09/2017

Ngày nhận lại: 03/10/2017

Duyệt đăng: 10/10/2017

Từ khóa:

chất điều hòa tăng trưởng thực vật, *Rosa canina*, *Rosa hybrida*, tạo rễ bất định

Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật Indole-3-acetic acid (IAA), Indole-3-butyric acid (IBA), 1-Napthalene acetic acid (NAA) và 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) ở các nồng độ khác nhau được dùng để cảm ứng sự tạo rễ bất định từ khúc cắt cành giâm cây hồng Tâm Xuân (*Rosa canina* L.) và khúc cắt chồi ngọn *in vitro* cây Hồng Nhung (*Rosa hybrida* L.). Các biến đổi hình thái và sinh lý trong quá trình hình thành rễ bất định được phân tích. Sự hình thành rễ bất định từ khúc cắt cành giâm cây hồng Tâm Xuân trải qua bốn giai đoạn: hoạt hóa tế bào tại vùng tương tầng, hình thành vùng tế bào mô phân sinh ngọn rễ, tạo sơ khởi rễ và kéo dài rễ. NAA ở nồng độ 300mg/L thích hợp cho sự phát triển rễ bất định từ khúc cắt cành giâm hồng Tâm Xuân. Trong quá trình phát triển rễ bất định, đặc biệt vào giai đoạn tạo sơ khởi rễ, có sự tăng mạnh cường độ hô hấp và hoạt tính IAA. Mối liên hệ giữa các chất điều hòa tăng trưởng thực vật, cường độ hô hấp và sự phát sinh hình thái rễ được thảo luận. Sự phối hợp bổ sung IBA 0,5mg/L và IAA 0,5mg/L vào môi trường MS ½ kích thích mạnh sự tạo rễ *in vitro* từ các khúc cắt chồi ngọn Hồng Nhung, phù hợp cho sự tạo các cây *in vitro* hoàn chỉnh.

ABSTRACT

Plant growth regulators including Indole-3-acetic acid (IAA), Indole-3-butyric acid (IBA), 1-Napthalene acetic acid (NAA) and 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) at different concentrations were used to induce adventitious rooting from the stem cuttings of Dog rose (*Rosa canina* L.) or the *in vitro* shoot explants of red Velvet rose (*Rosa hybrida* L.). Morphological and physiological changes in root formation were analyzed. The process of the adventitious root formation process in *Rosa canina* L. included four stages: activation of cell division in the

Keywords:

adventitious rooting, plant growth regulators, *Rosa canina*, *Rosa hybrida*

cambium, initiation of the meristematic region, the formation of root primordium and elongation of the root. 300mg/L NAA was strongly stimulated adventitious root formation in the cutting of *Rosa canina* L. In the root development of *Rosa*, especially in the root primordium stage, the respiration intensity and IAA contents were increased. The correlation of plant growth regulators, respiration intensity and adventitious root morphogenesis were discussed. The combination of IBA (0.5mg/L) and IAA (0.5mg/L) in ½ MS medium strongly induced root from the shoot explants of *Rosa hybrida* L. that is suitable for obtaining *in vitro* complete plants.

1. Mở đầu

Cây hoa hồng vừa có giá trị về mặt thẩm mỹ vừa có giá trị dược liệu (Debener & Linde, 2009; Lee et al., 2016). Tuy nhiên, cây hoa hồng đặc biệt là Hồng Nhung là cây thân gỗ, rất khó ra rễ trong điều kiện tự nhiên. Để sản xuất Hồng Nhung, người ta thường dùng cành Hồng Nhung ghép lên gốc ghép cây hồng dại như Tầm Xuân (Duong, 2008). Tuy nhiên, phương pháp này còn khá hạn chế trong việc tạo ra số lượng lớn cây giống Hồng Nhung đồng nhất và có chất lượng do phụ thuộc khá nhiều vào điều kiện thời tiết đồng thời đòi hỏi phải tốn khá nhiều công sức và thời gian. Do đó, việc nghiên cứu vi nhân giống *in vitro* nhằm tạo ra số lượng lớn cây Hồng Nhung có chất lượng là vấn đề rất được quan tâm. Vấn đề đặt ra là một cây *in vitro* hoàn chỉnh phải có bộ rễ phát triển hoàn chỉnh. Đây chính là một trong những bước quan trọng quyết định sự thành công của vi nhân giống thực vật, đặc biệt ở đối tượng Hồng Nhung. Trong vi nhân giống thực vật nói chung cũng như trong sự tạo rễ ở các cây thuộc chi *Rosa* nói riêng, bên cạnh vai trò của kiểu gen (giống trồng), khả năng tạo rễ của mẫu cây còn tùy thuộc vào nồng độ các chất điều hòa tăng trưởng thực vật sử dụng (Ambros, Vasilyeva, & Novikova, 2016; Pati, Rath, Sharma, Sood, & Ahuja, 2006). Chính vì vậy, để có thể tiến hành vi nhân giống Hồng Nhung *in vitro* một cách hiệu quả, việc tìm hiểu “Ảnh hưởng của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong sự hình thành rễ bất định ở hồng Tầm Xuân và Hồng Nhung” là thật sự cần thiết.

2. Vật liệu

Các đoạn thân cây hồng Tầm Xuân có chiều dài 20 ± 2 cm, mang 7 - 9 chồi nách được cung cấp bởi vườn hồng Xuân Thới Sơn, ấp 3, huyện Hóc Môn. Các nhánh mang hoa Hồng Nhung có chiều cao khoảng 50cm, được cung cấp bởi vườn hoa Nguyễn Đắc Thanh - khu phố 7, phường 4, Đà Lạt, Lâm Đồng.

3. Phương pháp

Quan sát các biến đổi hình thái trong quá trình phát triển rễ

Các biến đổi hình thái trong quá trình phát triển rễ bất định được quan sát trực tiếp bằng mắt thường hay kính hiển vi quang học thông qua sự cắt và nhuộm hai màu đỏ carmine - xanh iod.

Khảo sát ảnh hưởng của loại và nồng độ auxin trên sự phát triển rễ bất định từ khúc cắt cành giâm hồng Tầm Xuân

Các khúc cắt cành giâm có chiều dài khoảng 20 ± 2 cm, đường kính khoảng 8 - 10mm, mang 8 lá được cô lập. Dùng kéo loại bỏ các lá ở gốc cành giâm cho đến khi còn lại khoảng 4 lá kếp, tiếp tục loại bỏ các lá chết cho đến khi còn 4 lá chết. Ngâm phần gốc (khoảng 1cm) trong môi trường khoáng MS (Murashige & Skoog, 1962) lỏng (đối chứng) hay MS có bổ sung Indole-3-acetic acid (IAA, Merck), Indole-3-butyric acid (IBA, Merck), 1-Naphthalene acetic acid (NAA, Merck) hay 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D, Merck) ở các nồng độ 100, 200, 300, 400 hay 500mg/L trong 5 phút (Nasri, Fadakar, Saba, & Yousefi, 2015) có thay đổi. Sau đó, các khúc cắt được giâm vào các túi nilon chứa giá thể tro trấu, đặt trong vườn ươm ở điều kiện ánh sáng 3900 ± 200 lux, nhiệt độ $30 \pm 1^\circ\text{C}$ và độ ẩm $65 \pm 5\%$ (được xác định vào lúc 6 giờ 30 sáng) (Yeshiwas, Alemayehu, & Alemayehu, 2015). Sự hình thành rễ bất định được theo dõi theo thời gian. Số rễ và chiều dài rễ được xác định sau 13 ngày xử lý. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, mỗi lần 12 khúc cắt cành giâm.

Khảo sát ảnh hưởng của loại và nồng độ auxin trên sự hình thành và phát triển rễ bất định từ khúc cắt chồi ngọn hồng nhung in vitro

Các khúc cắt thân Hồng Nhung dài 2cm được cô lập từ nhánh mang hoa và vô trùng theo các bước sau: rửa dưới vòi nước, rửa bằng xà phòng và rửa sạch bằng nước cất, dung dịch Javel: nước cất (tỉ lệ 3:2 theo thể tích) trong 10 phút và còn 70% trong 1 phút. Sau đó, trong tủ cấy vô trùng, các mẫu cây được xử lý với hỗn hợp dung dịch HgCl_2 0,1% và tween 0,2% trong 10 phút, và rửa sạch bằng nước cất vô trùng (3 lần). Phần mô bị tổn thương trên khúc cắt được cắt bỏ đến khi mẫu cây có chiều dài khoảng 1cm và cấy vào ống nghiệm có đường kính 20cm chứa 10ml môi trường MS có bổ sung NAA 0,1mg/L và BA 0,5mg/L (Ambros et al., 2016; Pati et al., 2006) có thay đổi. Sau 20 ngày nuôi cấy, cụm chồi hình thành với các chồi có chiều cao khoảng 1cm. Các khúc cắt chồi ngọn được cô lập và cấy vào ống nghiệm có đường kính 20cm chứa 10ml môi trường sao cho phần gốc ngập trong môi trường khoảng 4mm. Môi trường được sử dụng trong nuôi cấy bao gồm MS hay MS có bổ sung IAA, IBA, NAA hay 2,4-D (Merck) ở các nồng độ 0,1; 0,5 hay 1mg/L. Các mẫu cây được đặt nuôi ở điều kiện ánh sáng 2000 ± 200 lux (12 giờ/ngày), nhiệt độ $22 \pm 1^\circ\text{C}$, ẩm độ $65 \pm 5\%$. Sau 10 ngày, phần gốc ngập trong môi trường (4mm) được cắt ngang thành 10 lát. Dưới kính hiển vi quang học, xác định số vùng trung tâm mô phân sinh ngọn rễ, sơ khởi rễ và rễ kéo dài (Tran, Bui, & Teng-Yung, 2009). Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, mỗi lần 6 mẫu cây.

Đo cường độ hô hấp

Cường độ hô hấp của vùng tạo rễ bất định (μl oxygen hấp thu/gam trọng lượng tươi/giờ) được xác định bằng phương pháp áp kế Warburg ở 25°C , trong tối, dựa trên sự thay đổi thể tích oxygen trong buồng đo (Bui, 2016; Meidner, 1984). Kết quả là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

Đo hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật

Hoạt tính IAA, ABA, zeatin và gibberellin trong khúc cắt cành giâm hồng Tầm Xuân và khúc cắt chồi ngọn Hồng Nhung *in vitro* được ly trích và cô lập bằng cách dùng các dung

môi thích hợp và thực hiện sắc ký trên bản mỏng silicagel 60 F254 (mã số 1.05554, Merck), ở nhiệt độ 25°C, với dung môi di chuyển chloroform: methanol: acid acetic (80:15:5 theo thể tích). Vị trí của các hormon tăng trưởng thực vật trên bản sắc ký được phát hiện nhờ quan sát dưới tia UV và so sánh với chất chuẩn (Yokota, Murofushi, & Takahashi, 1980). Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật được đo bằng phương pháp sinh trắc nghiệm. Hoạt tính IAA và acid abscisic lần lượt tỷ lệ thuận và nghịch với sai biệt chiều dài diệp tiêu lúa (*Oryza sativa* L.). Hoạt tính zeatin tỉ lệ thuận với sai biệt trọng lượng tươi từ diệp dưa leo (*Cucumis sativus* L.). Hoạt tính gibberellin tỉ lệ thuận với sai biệt chiều dài trụ hạ diệp cây mầm xà lách (*Lactuca sativa* L.) (Bui, 1992; Meidner, 1984).

Áp dụng phối hợp các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trên sự hình thành và phát triển rễ bất định từ khúc cắt chồi Hồng Nhung in vitro

Các khúc cắt chồi ngọn dài 1cm được nuôi cấy trên môi trường MS ½ có bổ sung IBA 0,5mg/L riêng lẻ hay phối hợp với IAA 0,5mg/L. Sau 10 ngày nuôi cấy, phần gốc của khúc cắt chồi (dài khoảng 4mm ngập trong môi trường) được cắt ngang thành 10 lát. Dưới kính hiển vi quang học, xác định số vùng trung tâm mô phân sinh ngọn rễ, sơ khởi rễ và rễ kéo dài. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, mỗi lần 6 mẫu cấy.

Tất cả các số liệu được xử lý bằng phần mềm Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) phiên bản 11.5 cho Windows.

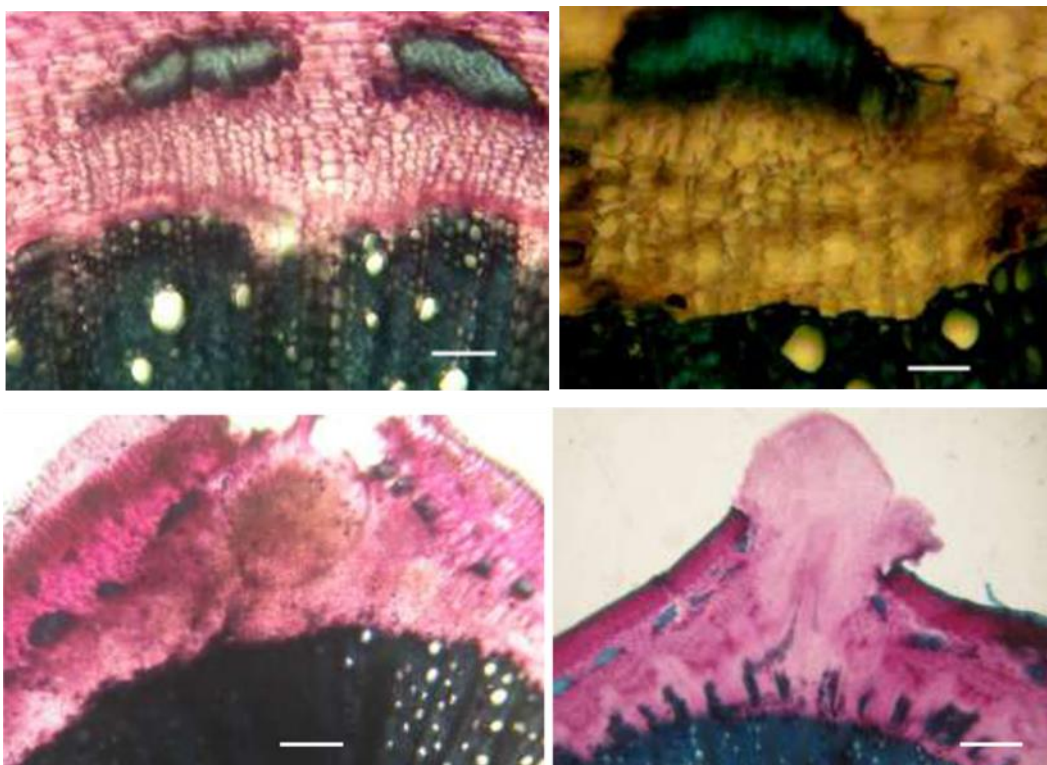
4. Kết quả

Các biến đổi hình thái giải phẫu học trong quá trình phát triển rễ bất định từ khúc cắt cành giâm hồng Tầm Xuân

Sự phát triển rễ bất định từ khúc cắt cành giâm hồng Tầm Xuân (đôi chứng) trải qua bốn giai đoạn, được phân biệt dưới kính hiển vi quang học: hoạt hóa tế bào tại vùng tương tầng với sự xuất hiện của nhóm tế bào đang ở trạng thái phân chia mạnh vào ngày 9 (Hình 1A), hình thành vùng tế bào mô phân sinh vào ngày 10 (Hình 1B), sơ khởi rễ vào ngày 12 (Hình 1C) và rễ kéo dài với đầy đủ cấu trúc của một rễ hoàn chỉnh vào ngày 15 (Hình 1D).

Ảnh hưởng của loại và nồng độ auxin trên sự tạo rễ bất định từ khúc cắt cành giâm hồng Tầm Xuân

Sau 13 ngày xử lý với auxin, ở cùng một nồng độ xử lý từ 200 đến 500mg/L, IBA và NAA cho số rễ bất định cao hơn so với IAA và đôi chứng (Hình 2, Bảng 1). Ở cùng một loại auxin như IBA, số rễ bất định tăng khi nồng độ xử lý từ 100 đến 500mg/L. Ở cùng nồng độ 300mg/L, IBA và NAA cho số rễ tương đương nhau. Số rễ đạt cao nhất khi xử lý với IBA 500mg/L. Chiều dài rễ dài nhất khi xử lý với NAA ở nồng độ 300 đến 500mg/L. Tuy nhiên, khi xử lý với IAA, IBA và NAA ở nồng độ 400 và 500mg/L, các khúc cắt cành giâm bị rụng lá. Trong trường hợp xử lý NAA 300mg/L, sự hình thành rễ xảy ra sớm hơn, sự hoạt hóa tế bào xảy ra vào ngày 4, hình thành sơ khởi rễ vào ngày 6 và kéo dài rễ vào ngày 9 (Hình 3).



Hình 1. Các giai đoạn hình thành rễ từ khúc cắt cành giâm ở hồng Tầm Xuân không xử lý chất điều hòa tăng trưởng thực vật. (A), hoạt hóa tế bào (ngày 9); (B), hình thành vùng tế bào mô phân sinh ngọn rễ (ngày 10); (C), hình thành sơ khởi rễ (ngày 12); (D), kéo dài rễ (ngày 15)

Bảng 1

Sự phát triển rễ từ khúc cắt cành giâm cây hồng Tầm Xuân sau 13 ngày xử lý chất điều hòa tăng trưởng thực vật ở các nồng độ thay đổi

Loại auxin	Nồng độ (mg/L)	Số rễ/cành giâm	Chiều dài rễ (cm)
Đối chứng (MS)		$0,29 \pm 0,18^j$	$0,47 \pm 0,31^g$
IAA	100	$2,14 \pm 0,26^{hi}$	$0,82 \pm 0,04^f$
	200	$2,14 \pm 0,14^{hi}$	$1,15 \pm 0,05^e$
	300	$0,71 \pm 0,29^{ij}$	$0,35 \pm 0,02^g$
	400	$6,14 \pm 0,34^g$	$1,44 \pm 0,05^{cde}$
	500	$7,00 \pm 0,31^{fg}$	$1,33 \pm 0,04^{cde}$
IBA	100	$3,00 \pm 0,22^h$	$1,39 \pm 0,10^{cde}$
	200	$5,86 \pm 0,51^g$	$1,20 \pm 0,04^e$
	300	$7,71 \pm 0,18^{ef}$	$1,57 \pm 0,06^{bcd}$
	400	$13,86 \pm 1,34^d$	$1,41 \pm 0,06^{cde}$
	500	$27,29 \pm 0,71^a$	$1,30 \pm 0,15^{de}$
NAA	100	$2,00 \pm 0,22^{hi}$	$1,19 \pm 0,06^e$
	200	$6,71 \pm 0,29^{fg}$	$1,64 \pm 0,06^{bc}$

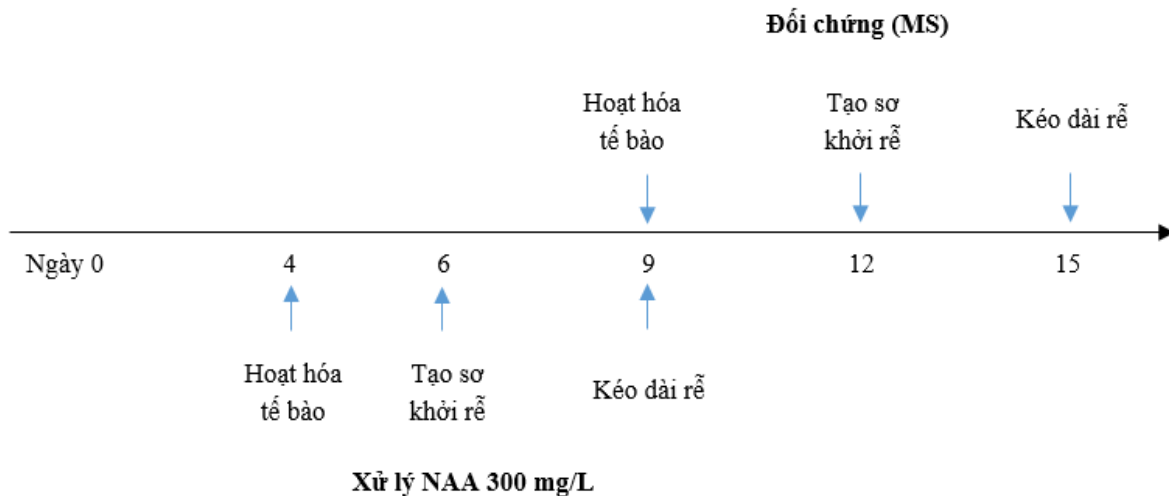
Loại auxin	Nồng độ (mg/L)	Số rễ/cành giâm	Chiều dài rễ (cm)
	300	8,57 ± 0,37 ^c	1,87 ± 0,06 ^{ab}
	400	18,43 ± 0,30 ^b	1,98 ± 0,09 ^a
	500	15,57 ± 0,43 ^c	1,95 ± 0,06 ^a

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức p=0,05

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu



Hình 2. Sự phát triển rễ từ khúc cắt cành giâm hồng Tầm Xuân sau 13 ngày xử lý với các loại auxin khác nhau. (A), Đối chứng; (B), IAA 300mg/L; (C), IBA 300mg/L; (D), NAA 300mg/L



Hình 3. Ảnh hưởng của NAA 300mg/L lên sự tạo rễ bất định từ khúc cắt cành giâm hồng Tầm Xuân

Cường độ hô hấp của vùng tạo rễ bất định ở khúc cắt cành giâm hồng Tầm Xuân

Trong cả hai trường hợp đối chứng và xử lý NAA 300mg/L cường độ hô hấp của vùng tạo rễ bất định ở khúc cắt cành giâm hồng Tầm Xuân tăng mạnh vào giai đoạn hình thành sơ khởi rễ và kéo dài rễ. Cường độ hô hấp mạnh hơn khi xử lý với NAA 300mg/L (Bảng 2).

Bảng 2

Sự thay đổi cường độ hô hấp của vùng tạo rễ bất định ở khúc cắt cành giâm hồng Tầm Xuân

Giai đoạn phát triển rễ	Cường độ hô hấp ($\mu\text{O}_2/\text{g TLT /giờ}$)		T-test
	Đối chứng (MS)	NAA 300mg/L	
Ngày 0	130,35 \pm 25,35 ^b	130,35 \pm 25,35 ^b	
Sơ khởi rễ	163,46 \pm 23,12 ^{ab}	335,03 \pm 62,22 ^a	*
Rễ kéo dài	237,51 \pm 24,89 ^a	387,68 \pm 41,45 ^a	*

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p=0,05$.

(*), Các số trung bình trong hàng khác biệt có ý nghĩa ở mức $p=0,05$ (T-test).

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật của vùng tạo rễ bất định ở khúc cắt cành giâm hồng Tầm Xuân

Hoạt tính IAA của vùng tạo rễ bất định ở cả 2 trường hợp xử lý hay không xử lý NAA 300mg/L đều gia tăng vào giai đoạn tạo sơ khởi rễ, sau đó giảm vào giai đoạn kéo dài rễ. Hoạt tính zeatin gia tăng vào giai đoạn kéo dài rễ ở mẫu đối chứng. Hoạt tính ABA không thay đổi trong quá trình phát triển rễ. Hoạt tính gibberellin ở giai đoạn kéo dài rễ gia tăng ở mẫu đối chứng và giảm khi xử lý với NAA 300mg/L (Bảng 3).

Bảng 3

Hoạt tính chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh của vùng tạo rễ bất định ở khúc cắt cành giâm hồng Tầm Xuân

Giai đoạn tạo rễ	Hoạt tính chất điều hòa tăng trưởng thực vật (mg/L)							
	IAA		Zeatin		ABA		GA ₃	
	Đối chứng (MS)	NAA 300 mg/L	Đối chứng (MS)	NAA 300 mg/L	Đối chứng (MS)	NAA 300 mg/L	Đối chứng (MS)	NAA 300 mg/L
Ngày 0	0,00 ^b	0,00 ^c	0,02 ^b	0,02 ^a	0,48 ^a	0,48 ^a	0,41 ^b	0,41 ^b
Sơ khởi rễ	0,54 ^{a*}	2,00 ^{a*}	0,20 ^{ab}	0,08 ^a	0,25 ^a	0,17 ^a	0,33 ^b	0,44 ^{ab}
Kéo dài rễ	0,23 ^{b*}	1,25 ^{b*}	0,38 ^a	0,11 ^a	0,18 ^a	0,00 ^a	3,91 ^{a*}	0,09 ^{c*}

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p=0,05$

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Ảnh hưởng của loại và nồng độ auxin lên sự phát triển rễ từ khúc cắt chồi ngọn Hồng Nhung in vitro

Sự phát triển rễ bất định từ khúc cắt chồi ngọn Hồng Nhung *in vitro* trải qua 4 giai đoạn tương tự như trường hợp khúc cắt cành giâm hồng Tầm Xuân. Sau 10 ngày nuôi cấy, số vùng trung tâm mô phân sinh ngọn rễ cao nhất khi xử lý với IBA 0,5mg/L. Số sơ khởi rễ của mẫu cấy cao nhất khi xử lý với IBA 0,5mg/L, NAA 0,5mg/L hay 1mg/L. Số rễ kéo dài tăng mạnh so với đối chứng khi xử lý với IAA 0,5mg/L; IBA, NAA 0,5mg/L hay 1mg/L; 2,4-D 0,1 đến 1mg/L (Bảng 4, Hình 4). Khi sử dụng 2,4-D, mẫu cấy có sự tạo mô sẹo ở phần gốc. Khả năng tạo rễ bất định tốt nhất (số vùng trung tâm mô phân sinh ngọn rễ, sơ khởi rễ và rễ kéo dài cao nhất) khi xử lý với IBA 0,5mg/L.

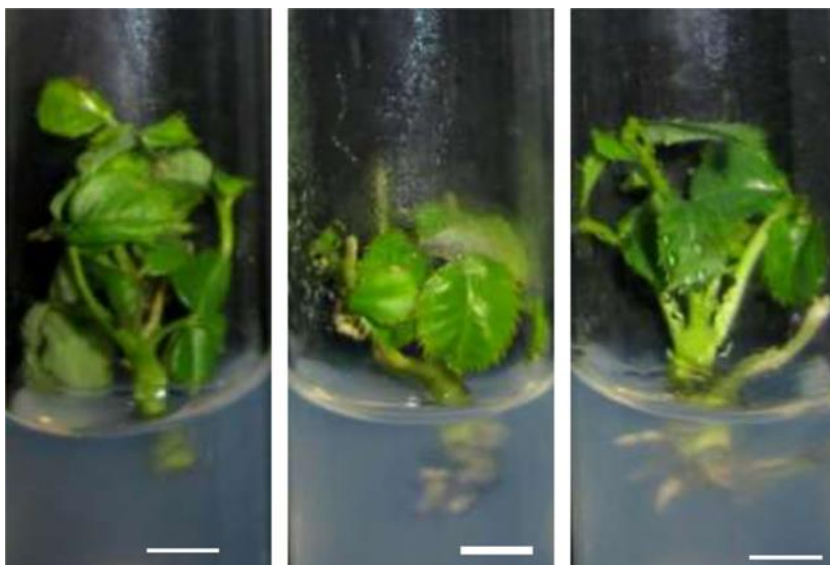
Bảng 4

Ảnh hưởng của chất điều hòa tăng trưởng thực vật lên sự phát triển rễ bất định sau 10 ngày nuôi cấy khúc cắt chồi ngọn cây Hồng Nhung *in vitro*

Auxin	Nồng độ (mg/L)	Số vùng trung tâm mô phân sinh ngọn rễ/ mẫu cấy	Số sơ khởi rễ/ mẫu cấy	Số rễ kéo dài/ mẫu cấy
Đối chứng (MS ½)		0,33 ± 0,21 ^{de}	0,67 ± 0,49 ^e	0,33 ± 0,21 ^d
IAA	0,1	0,00 ± 0,00 ^e	0,50 ± 0,34 ^e	1,67 ± 0,42 ^{cd}
	0,5	0,83 ± 0,31 ^{de}	0,33 ± 0,21 ^e	4,67 ± 0,49 ^b
	1	0,67 ± 0,33 ^{de}	1,00 ± 0,37 ^e	1,67 ± 0,33 ^{cd}
IBA	0,1	0,00 ± 0,00 ^e	1,33 ± 0,33 ^e	0,83 ± 0,31 ^{cd}
	0,5	7,17 ± 0,40 ^a	5,33 ± 0,33 ^{ab}	7,17 ± 0,54 ^a
	1	4,50 ± 0,22 ^b	4,50 ± 0,22 ^b	4,50 ± 0,72 ^b
NAA	0,1	2,33 ± 0,33 ^c	3,00 ± 0,68 ^{cd}	0,83 ± 0,17 ^{cd}
	0,5	2,20 ± 0,58 ^c	6,00 ± 0,37 ^a	2,17 ± 0,65 ^c
	1	3,00 ± 0,26 ^c	6,33 ± 0,56 ^a	7,00 ± 0,58 ^a
2,4-D	0,1	0,83 ± 0,40 ^{de}	1,50 ± 0,56 ^e	4,00 ± 0,93 ^b
	0,5	1,17 ± 0,40 ^d	4,17 ± 0,60 ^{bc}	5,17 ± 0,91 ^b
	1	0,33 ± 0,21 ^{de}	2,83 ± 0,31 ^d	4,33 ± 0,42 ^b

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức p=0,05

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu



Hình 4. Sự hình thành rễ bất định từ khúc cắt chồi ngọn Hồng Nhung *in vitro* sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường có hay không bổ sung auxin. (A), MS ½ (đối chứng); (B), NAA 1mg/L; (C), IBA 0,5mg/L

Cường độ hô hấp của khúc cắt chồi ngọn Hồng Nhung *in vitro*

Cường độ hô hấp của mẫu cây chồi ngọn Hồng Nhung 10 ngày tuổi tăng trưởng trên môi trường có bổ sung IBA 0,5mg/L hay NAA 1mg/L tăng mạnh so với đối chứng (Bảng 5).

Bảng 5

Cường độ hô hấp của khúc cắt chồi ngọn cây hoa Hồng Nhung *in vitro* sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường có bổ sung auxin khác nhau

Auxin	Cường độ hô hấp ($\mu\text{L O}_2/\text{g TLT /giờ}$)
Đối chứng (MS ½)	204,60 \pm 6,60 ^b
IBA 0,5mg/L	321,03 \pm 51,52 ^a
NAA 1mg/L	332,64 \pm 55,44 ^a

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức $p=0,05$

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong khúc cắt chồi ngọn Hồng Nhung *in vitro*

Hoạt tính IAA tăng mạnh ở mẫu cây Hồng Nhung sau 10 ngày xử lý với auxin. Hoạt tính IAA ở mẫu cây xử lý với IBA tăng mạnh so với xử lý NAA. Hoạt tính zeatin giảm trong cả hai trường hợp xử lý hay không xử lý auxin. Hoạt tính GA₃ và ABA không thay đổi sau 10 ngày nuôi cấy (Bảng 6).

Bảng 6

Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong khúc cắt chồi ngọn Hồng Nhung *in vitro* tăng trưởng trên các môi trường nuôi cấy khác nhau

Thời gian (ngày)	Auxin	Hoạt tính chất điều hòa tăng trưởng thực vật (mg/L)			
		IAA	Zeatin	ABA	GA ₃
0		0,08 ± 0,04 ^c	0,50 ± 0,15 ^a	0,40 ± 0,05 ^a	0,50 ± 0,15 ^a
10	Đối chứng (MS ½)	0,13 ± 0,03 ^c	0,02 ± 0,01 ^b	0,25 ± 0,03 ^a	0,52 ± 0,08 ^a
	IBA 0,5mg/L	0,60 ± 0,03 ^a	0,09 ± 0,05 ^b	0,58 ± 0,09 ^a	0,56 ± 0,04 ^a
	NAA 1mg/L	0,40 ± 0,10 ^b	0,18 ± 0,10 ^b	0,28 ± 0,07 ^a	0,66 ± 0,12 ^a

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau khác biệt có ý nghĩa ở mức p=0,05

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Áp dụng phối hợp của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trên sự phát triển rễ từ khúc cắt chồi ngọn Hồng Nhung in vitro

Sự phối hợp IBA 0,5mg/L và IAA 0,5mg/L giúp gia tăng số mô phân sinh ngọn rễ và sơ khởi rễ nhưng không làm tăng số rễ kéo dài (Bảng 7).

Bảng 7

Ảnh hưởng phối hợp của chất điều hòa tăng trưởng thực vật trên sự phát triển rễ sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường kết hợp lên khúc cắt chồi ngọn cây Hồng Nhung *in vitro*

Môi trường nuôi cấy	Số mô phân sinh ngọn rễ	Số sơ khởi rễ	Số rễ kéo dài
MS ½ với IBA 0,5mg/L	7,17 ± 1,72	5,33 ± 0,96	7,17 ± 1,49
MS ½ với IBA 0,5mg/L và IAA 0,5mg/L	13,00 ± 1,03	10,17 ± 2,71	3,83 ± 1,30
T-test	*	*	*

Các số trung bình trong cột khác biệt có ý nghĩa ở mức p = 0,05 (T-test)

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

5. Thảo luận

Sự tạo rễ bất định từ khúc cắt cành giâm hồng Tầm Xuân và khúc cắt chồi ngọn Hồng Nhung *in vitro* đều có nguồn gốc nội sinh và trải qua bốn giai đoạn như đã được mô tả bởi Leakey (1985), Tran và cộng sự (2009) bao gồm: hoạt hóa tế bào, hình thành vùng tế bào mô phân sinh ngọn rễ, tạo sơ khởi rễ và kéo dài rễ (Hình 1).

Ở khúc cắt cành giâm hồng Tầm Xuân, trong cả hai trường hợp đối chứng và xử lý NAA 300mg/L, giai đoạn tạo sơ khởi rễ có cường độ hô hấp tăng (so với ngày 0) và hoạt tính IAA đạt giá trị cao nhất. Chính vì vậy, tất cả các xử lý với auxin ở các nồng độ khác nhau (100 - 500mg/L) đều kích thích sự tạo rễ. Số rễ cũng như chiều dài rễ gia tăng theo nồng độ xử lý. Trong đó, IBA 500mg/L cho số rễ cao nhất trong khi NAA 300 - 500mg/L cho chiều dài rễ cao nhất. Các nghiên cứu trên *Rosa damascene* cho thấy IBA ở nồng độ 500mg/L cho số rễ và phần trăm mẫu tạo rễ cao nhất (Nasri et al., 2015). Trong khí đó, ở khúc cắt cành giâm Hồng Tầm

Xuân, xử lý với IBA hay NAA (300 - 500mg/L) đều cho hiệu quả tạo rễ cao. Tuy nhiên, ở nồng độ 400 và 500mg/L, IBA hay NAA đều gây hiện tượng hoạt hóa và rụng lá. Ở cùng nồng độ 300mg/L, NAA và IBA cho số rễ tương đương nhau nhưng NAA cho rễ dài hơn (Bảng 1). Như vậy, xử lý NAA ở nồng độ 300mg/L là thích hợp cho sự tạo rễ bất định ở hồng Tầm Xuân vì vừa cho số rễ và chiều dài rễ cao vừa không gây rụng lá. Đặc biệt, NAA 300mg/L còn giúp rút ngắn thời gian tạo rễ bất định được 6 ngày so với đối chứng (MS). Giai đoạn hoạt hóa tế bào từ 9 ngày được rút ngắn còn 4 ngày; sự tạo sơ khởi rễ từ 12 ngày còn 6 ngày và sự kéo dài rễ từ 15 ngày còn 9 ngày (Hình 3). Vai trò của auxin trong sự phát triển rễ đã được chứng minh ở nhiều đối tượng thực vật. Auxin giúp hoạt hóa các bơm proton H^+ trên màng nguyên sinh chất, acid hóa vách tế bào, làm vách tế bào trở nên lỏng lẻo, đồng thời kích thích quá trình phân chia và hấp thu nước từ môi trường cần thiết cho sự tăng trưởng tế bào trong giai đoạn tạo sơ khởi rễ (Bui, 2016; Taiz & Zeiger, 2010). Do đó, hoạt tính IAA tăng mạnh vào giai đoạn này (Bảng 3). Để tạo sơ khởi rễ, các tế bào phân chia mạnh cần nhiều năng lượng và tiền chất cung cấp từ quá trình hô hấp. Chính vì vậy, cường độ hô hấp tăng rất mạnh, đặc biệt ở trường hợp xử lý NAA 300mg/L. Vào giai đoạn kéo dài rễ, cường độ hô hấp tiếp tục gia tăng nhưng không mạnh như giai đoạn tạo sơ khởi rễ (Bảng 2). Ở giai đoạn kéo dài rễ, hoạt tính IAA vẫn giữ ở mức cao so với ngày 0. Tuy nhiên, so với giai đoạn tạo sơ khởi rễ, hoạt tính IAA giảm (Bảng 3). Auxin kích thích kéo dài tế bào, phân hóa mạch dẫn. Auxin ở nồng độ cao kích thích quá trình tạo sơ khởi rễ nhưng lại ức chế quá trình kéo dài rễ (Ito et al., 2016), hoạt hóa enzyme làm lỏng lẻo vách tế bào ở mức độ cao (Somssich, Khan, & Persson, 2016), đặc biệt là các tế bào ở vùng rụng của lá (Bui, 2016). Do đó các xử lý auxin ở nồng độ quá cao (400 và 500mg/L) cho số rễ nhiều, nhưng rễ không kéo dài đồng thời xuất hiện hiện tượng rụng lá.

Tương tự như trường hợp khúc cắt cành giâm hồng Tầm Xuân, các xử lý với auxin trên khúc cắt chồi ngọn Hồng Nhung *in vitro* cũng cho thấy vai trò quan trọng của loại và nồng độ auxin trong sự tạo rễ bất định. IBA và NAA cũng là hai loại auxin cho hiệu quả cao trong sự tạo rễ *in vitro* ở Hồng Nhung. Sau 10 ngày nuôi cấy, số sơ khởi rễ và kéo dài rễ của các khúc cắt chồi Hồng Nhung đạt cao nhất khi xử lý với IBA 0,5mg/L hay NAA 1mg/L (Bảng 4). Trên hai môi trường này, các khúc cắt chồi đều có cường độ hô hấp và hoạt tính IAA gia tăng so với đối chứng (MS ½). Tuy nhiên, so với NAA 1mg/L, xử lý IBA 0,5mg/L giúp hoạt tính IAA trong khúc cắt chồi Hồng Nhung tăng mạnh hơn. Sự tăng mạnh hoạt tính IAA tương ứng với sự tạo số mô phân sinh ngọn rễ của mẫu cấy cũng nhiều hơn. Do đó, việc áp dụng phối hợp IBA 0,5mg/L và IAA 0,5mg/L đã làm tăng mạnh khả năng tạo rễ của khúc cắt chồi Hồng Nhung *in vitro* (Bảng 7), cho phép thu nhận cây *in vitro* hoàn chỉnh, góp phần hoàn chỉnh quy trình vi nhân giống loài cây này.

6. Kết luận

Quá trình hình thành rễ bất định từ khúc cắt cành giâm hồng Tầm Xuân hay khúc cắt chồi Hồng Nhung *in vitro* đều trải qua 4 giai đoạn: hoạt hóa tế bào (tại vùng tương tầng libe - mọt), tạo nhóm tế bào vùng trung tâm mô phân sinh ngọn rễ, sơ khởi rễ và kéo dài rễ. Xử lý NAA 300mg/L trong 5 phút kích thích sự tạo và kéo dài rễ từ khúc cắt cành giâm hồng Tầm Xuân đồng thời giúp rút ngắn thời gian ra rễ 6 ngày so với đối chứng. Xử lý auxin làm tăng cường độ hô hấp và hoạt tính IAA, đặc biệt vào giai đoạn tạo sơ khởi rễ. Môi trường MS ½ có

bổ sung IBA 0,5mg/L và IAA 0,5mg/L thích hợp cho sự tạo rễ từ khúc cắt chồi ngọn Hồng Nhung *in vitro*.

Tài liệu tham khảo

- Ambros, E. V., Vasilyeva, O. Y., & Novikova, T. I. (2016). Effects of *in vitro* propagation on ontogeny of *Rosa canina* L. micropropagated plants as a promising rootstock for ornamental roses. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 17(1/2), 72-78.
- Bui, V. T. (1992). Tìm hiểu hoạt động của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật thiên nhiên trong hiện tượng rụng “bông” và “trái non” Tiêu (*Piper nigrum* L.) [Investigate the activity of natural plant growth regulators in pepper “cotton” and “young fruit” shedding (*Piper nigrum* L.)]. *Tạp san khoa học Đại học Tổng hợp Thành phố Hồ Chí Minh*, 1, 155-165.
- Bui, V. T. (2016). *Sinh lý thực vật đại cương [General plant physiology]*. Ho Chi Minh City Vietnam: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh.
- Debener, T., & Linde, M. (2009). Exploring complex ornamental genomes: The rose as a model plant. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 28(4), 267-280.
- Duong, K. C. (2008). *Hoa hồng kỹ thuật trồng chăm sóc và trang trí [Technical rose planting care and decoration]*. Hanoi, Vietnam: Nhà xuất bản Nông Nghiệp.
- Ito, J., Fukaki, H., Onoda, M., Li, L., Li, C., Tasaka, M., & Furutani, M. (2016). Auxin-dependent compositional change in Mediator in ARF7-and ARF19-mediated transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(23), 6562-6567.
- Leakey, R. R. B. (1985). The capacity for vegetative propagation in trees. In M. G. R. Cannell & J. E. Jackson (Eds.), *Attributes of trees as crop plants* (pp. 110-133). Abbots Ripton, UK: Institute of Terrestrial Ecology.
- Lee, S. J., Won, S. Y., Park, S. L., Song, J. H., Noh, D. H., Kim, H., ... Moon, S. K. (2016). *Rosa hybrida* extract suppresses vascular smooth muscle cell responses by the targeting of signaling pathways, cell cycle regulation and matrix metalloproteinase-9 expression. *International Journal of Molecular Medicine*, 37(4), 1119-1126.
- Meidner, H. (1984). *Class experiments in plant physiology*. London, UK: George Allen and Unwin.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nasri, F., Fadakar, A., Saba, M. K., & Yousefi, B. (2015). Study of indole butyric acid (IBA) effects on cutting rooting improving some of wild genotypes of damask roses (*Rosa damascena* Mill.). *Journal of Agricultural Sciences*, 60(3), 263-275.
- Pati, P. K., Rath, S. P., Sharma, M., Sood, A., & Ahuja, P. S. (2006). *In vitro* propagation of rose - A review. *Biotechnology Advances*, 24, 94-114.
- Somssich, M., Khan, G. A., & Persson, S. (2016). Cell wall heterogeneity in root development of *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 7, Article 1242.

- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant physiology*. San Francisco, CA: The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc.
- Tran, H. T., Bui, V. T., & Teng-Yung, F. (2009). Vai trò của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong sự hình thành rễ bất định từ các khúc cắt mang chồi ở một vài giống chuối (*Musa sp.*) [The role of plant growth regulators in root uncertainty from shoot cuttings in some varieties of banana (*Musa sp.*)]. *Tạp chí Phát triển Khoa học & Công nghệ*, 12(9), 23-30.
- Yeshiwas, T., Alemayehu, M., & Alemayehu, G. (2015). Effects of Indole Butyric Acid (IBA) and stem cuttings on growth of stenting-propagated rose in Bahir Dar, Ethiopia. *World Journal of Agricultural Sciences*, 11(4), 191-197.
- Yokota, T., Murofushi, N., & Takahashi, N. (1980). Extraction, purification, and identification. In J. MacMillan (Ed.), *Hormonal regulation of development I. molecular aspects of plant hormones* (pp. 113-201). Berlin, Germany: Springer Verlag.