

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY HỒNG NHUNG CỎ (*Rosa* sp.)

Khuất Thị Hải Ninh¹, Nguyễn Thị Thơ¹, Kiều Trí Đức¹,
Nguyễn Thế Hưởng¹, Hồ Thị Xuân Hồng¹

¹Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Hồng nhung cỏ (*Rosa* sp.) là một trong những giống hoa hồng quý của Việt Nam, có mùi thơm dễ chịu, bên cạnh việc sử dụng làm trang trí trong gia đình, còn được sử dụng để chưng cất tinh dầu dùng rộng rãi trong công nghệ mỹ phẩm và dược phẩm. Nhân giống *in vitro* giúp tạo ra cây giống sạch bệnh và cung cấp số lượng lớn cây con cho trồng vùng nguyên liệu. Kết quả nghiên cứu nhân giống cây Hồng nhung cỏ bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro* cho thấy: Công thức khử trùng hiệu quả nhất để tạo mẫu sạch từ chồi là sử dụng HgCl₂ 0,1%, trong vòng 6 phút với 38,9% mẫu sạch này chồi sau 3 tuần nuôi cấy. Môi trường thích hợp nhất tái sinh chồi là MS + 1,5 mg/l BAP chiều cao chồi lớn nhất (đạt 2,1 cm) và 2,4 chồi tái sinh/nách lá, chất lượng chồi tốt (chồi xanh và mập) sau 8 tuần nuôi cấy. Môi trường MS + 1 mg/l BAP + 0,5 mg/kinetin + 0,3 mg/l NAA cho hiệu quả nhân nhanh chồi tốt nhất với tỉ lệ mẫu tạo cụm chồi đạt 94,4%, chiều cao chồi đạt 4,1 cm, hệ số nhân chồi đạt 3,9 lần sau 8 tuần nuôi cấy. Tạo cây con hoàn chỉnh trong môi trường MS + 0,5 mg/l IBA với tỉ lệ chồi ra rễ đạt 97,8%, 3,8 rễ/chồi và rễ dài 3,5 cm, rễ có chất lượng tốt sau 2 tuần nuôi cấy. Quy trình nhân giống thành công có thể áp dụng vào thực tiễn phục vụ sản xuất cây giống Hồng nhung cỏ chất lượng cao, đáp ứng tốt nhu cầu cây giống hiện nay.

Từ khóa: BAP, Hồng nhung cỏ, IBA, nhân giống, nuôi cấy mô.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây hoa hồng thuộc họ hoa hồng (Rosaceae) là một loài cây cho hoa đẹp, được trồng phổ biến ở nhiều quốc gia trên thế giới. Cây hoa hồng được trồng với nhiều mục đích khác nhau như: trang trí làm đẹp cho không gian sống, làm nước hoa, mỹ phẩm và thuốc chữa bệnh. Tinh dầu hoa hồng là nguyên liệu có nguồn gốc từ thiên nhiên, có mặt trong nhiều sản phẩm chăm sóc da cao cấp với đặc tính an toàn, giá thành phải chăng, chăm sóc làn da từ sâu bên trong. Vì vậy, tinh dầu hoa hồng không chỉ cung cấp những dưỡng chất thiết yếu cho làn da, mà còn chăm sóc sức khỏe hiệu quả. Hồng nhung cỏ là một trong những giống hoa hồng quý của Việt Nam, có mùi thơm dễ chịu bên cạnh việc sử dụng làm trang trí trong gia đình, còn được sử dụng để chưng cất tinh dầu sử dụng rất rộng rãi trong công nghệ mỹ phẩm và dược phẩm. Vì vậy, việc nhân giống để gây trồng Hồng nhung cỏ cung cấp nguồn nguyên liệu cho chưng cất tinh dầu là rất cần thiết.

Hiện nay nhiều cơ sở sản xuất tinh dầu quan tâm đến trồng Hồng nhung cỏ để chiết xuất tinh dầu do vậy nhu cầu về nguồn giống là rất lớn. Mặc dù có nhiều phương pháp nhân giống truyền thống đối với loài cây này như chiết, ghép hoặc giâm hom. Tuy nhiên, do các phương

pháp nhân giống truyền thống trên cung cấp số lượng cây giống hạn chế khi trồng trên diện tích lớn. Vì vậy, nhân giống *in vitro* giúp khắc phục nhược điểm trên, ngoài ra cây tạo giống sạch bệnh và chủ động cho việc trồng vùng nguyên liệu trên qui mô lớn.

Ở Việt Nam có nhiều công trình nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây hoa hồng như: Hồng cỏ sapa (Bùi Thị Thu Hương và cộng sự, 2017; Nguyễn Văn Việt, 2017), Hồng nhung mê linh (La Việt Hồng và cộng sự, 2019), Hồng tỉ muội (Nguyễn Ngọc Quỳnh Thơ, 2018). Tuy nhiên, các nghiên cứu về nhân giống *in vitro* Hồng nhung cỏ còn rất hạn chế.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Vật liệu nghiên cứu: Chồi non được lấy trên cây mẹ đã được chọn lọc (cây mẹ sinh trưởng tốt, không sâu bệnh, để chồi mạnh, chồi mập và ngọn phát triển tốt) tại vườn trồng cây Hồng nhung cỏ của cơ sở sản xuất tinh dầu Lê Qué (Địa chỉ: thôn Thượng Phúc, xã Đồng Phú, huyện Chương Mỹ, thành phố Hà Nội).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành theo các bước tạo mẫu sạch, tái sinh chồi, tạo cụm chồi và tạo cây con hoàn chỉnh. Mỗi công thức thí nghiệm được bố trí 3 lần lặp, mỗi lặp 30 mẫu. Cụ thể:

a) Tạo mẫu sạch và nuôi cấy khởi động

Thí nghiệm 1. Ảnh hưởng của thời gian xử lý chồi bằng HgCl₂ 0,1% đến tỉ lệ mẫu sạch.

Mẫu được sử dụng là chồi bên thân cây mẹ đã được trẻ hóa (trước thời điểm lấy chồi khoảng 2 tháng), nách lá có chồi ngủ nhưng chưa phát triển, cắt bỏ lá để lại cuống lá. Rửa sạch mẫu cấy dưới vòi nước chảy, đặt mẫu trong nước xà phòng loãng, dùng chổi lông để rửa mẫu, sau đó rửa sạch mẫu. Tráng nhiều lần bằng nước cất, đựng mẫu trong bình scott.

Khử trùng trong box cấy: Đưa bình scott đựng mẫu vào trong box cấy, đầu tiên mẫu được rửa bằng nước cất vô trùng 2 - 3 lần, mỗi lần lắc mẫu khoảng 2 - 3 phút. Sau đó, mẫu cấy được lắc trong cồn 70⁰ trong thời gian 30 giây và rửa sạch bằng nước cất vô trùng. Cuối cùng, mẫu được khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% với thời gian khác nhau (4; 5; 6 và 7 phút).

Sau mỗi lần khử trùng bằng HgCl₂ 0,1%, đổ bỏ hết dung dịch diệt khuẩn và lắc mạnh bằng nước cất đã vô trùng nhiều lần (mỗi lần từ 3 - 5 phút). Mẫu được dùng panh và kéo để cắt bỏ bớt những phần mô bị thâm do ngấm dung dịch thủy ngân hoặc những phần mẫu già rồi cấy vào môi trường MS + 30 g đường sucrose + 6 g/l Agar, pH môi trường 5,8 (mẫu cấy có chiều dài 2 - 3 cm, có ít nhất 1 mắt ngủ).

Các chỉ tiêu được xác định gồm: Tỉ lệ mẫu sạch sống (%), tỉ lệ mẫu sạch chết (%), tỉ lệ mẫu nhiễm (%) sau 3 tuần nuôi cấy.

b) Phương pháp tái sinh chồi

Thí nghiệm 2: Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng tái sinh chồi từ mắt ngủ

Các mẫu sạch được cấy chuyển sang môi trường MS + 30 g đường sucrose + 6 g/l Agar, pH môi trường 5,8 bổ sung BAP ở các nồng độ 0,5; 1; 1,5 và 2 mg/l để tìm hiểu khả năng tái sinh chồi từ mắt ngủ. Sử dụng môi trường tốt nhất để nhân chồi trong 3 - 4 chu kỳ nhằm tăng số lượng chồi cho các nghiên cứu tiếp theo.

Các chỉ tiêu được xác định gồm: Tỉ lệ mẫu tái sinh (%), chiều cao chồi (cm), số chồi tái sinh/nách lá, chất lượng chồi (Chồi có phẩm chất tốt: Màu xanh non, khỏe mạnh, mập mạp; chồi có phẩm chất trung bình: Màu xanh - vàng

và nhỏ; chồi có phẩm chất xấu: Màu vàng nhạt và nhỏ) sau 8 tuần nuôi cấy.

c) Phương pháp tạo cụm chồi

- Thí nghiệm 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ BAP và Kinetin đến khả năng tạo cụm chồi.

Các chồi được hình thành từ thí nghiệm 2 được tách ra và cấy chuyển sang môi trường MS + 30 g đường sucrose + 6 g/l Agar, pH môi trường 5,8 có bổ sung cố định 0,5 mg/l kinetin kết hợp với BAP ở các nồng độ 0,5; 1; 1,5 và 2 mg/l để nghiên cứu khả năng tạo cụm chồi.

- Thí nghiệm 4: Nghiên cứu ảnh hưởng của BAP, Kinetin và NAA đến khả năng tạo cụm chồi

Sử dụng công thức tốt nhất ở thí nghiệm 3 bổ sung 0,1; 0,3; 0,5 và 0,7 mg/l NAA.

Các chỉ tiêu được xác định gồm: Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi (%), chiều cao chồi (cm), hệ số nhân chồi (lần) và chất lượng chồi sau 8 tuần nuôi cấy.

d) Phương pháp tạo cây hoàn chỉnh

Các chồi có chiều cao từ 3 - 4 cm được cấy chuyển sang môi trường MS + 30 g đường sucrose + 6 g/l Agar bổ sung IBA (0,3; 0,5; 1; 1,5 và 2 mg/l) để tạo cây con hoàn chỉnh. Môi trường có bổ sung 0,4 g/l than hoạt tính.

Các chỉ tiêu được xác định gồm: Tỉ lệ ra rễ (%), số rễ/cây và chiều dài rễ (cm), chất lượng rễ sau 2 tuần nuôi cấy.

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

So sánh giữa các công thức thí nghiệm về tỉ lệ mẫu sạch, tỉ lệ mẫu tạo cụm chồi, tỉ lệ chồi ra rễ bằng tiêu chuẩn khi bình phương (χ^2), đồng thời tìm công thức tốt nhất bằng tiêu chuẩn U (so sánh 2 mẫu về chất). So sánh giữa các công thức thí nghiệm về số lượng chồi/cụm, chiều dài chồi, chiều dài rễ và số lượng rễ/cây bằng phân tích phương sai một nhân tố, tìm công thức tốt nhất bằng tiêu chuẩn Duncan.

Số liệu đã thu thập được xử lý bằng phần mềm SPSS (Nguyễn Hải Tuất và Nguyễn Trọng Bình, 2005) và phần mềm Excel.

2.4. Địa điểm nghiên cứu

Thí nghiệm được tiến hành tại Phòng Nuôi cấy mô - tế bào thực vật thuộc Viện Công nghệ sinh

học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp.

Các môi trường nuôi cấy được điều chỉnh ở độ pH 5,8, chiếu sáng 10h trong ngày, với cường độ ánh sáng 2000 - 3000 lux, nhiệt độ phòng nuôi $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng mẫu bằng HgCl_2 0,1% đến khả năng tạo mẫu sạch của cây Hồng nhung cổ (sau 3 tuần nuôi cấy)

STT	Thời gian khử trùng bằng HgCl_2 0,1% (phút)	Số mẫu thí nghiệm	Mẫu sạch nảy chồi		Mẫu sạch chết		Mẫu nhiễm	
			Số mẫu (N)	Tỷ lệ (%)	Số mẫu (N)	Tỷ lệ (%)	Số mẫu (N)	Tỷ lệ (%)
1	4,0	90	5	5,5 ^c	0	0,0	85	94,4
2	5,0	90	20	22,2 ^b	0	0,0	70	77,8
3	6,0	90	35	38,9 ^a	0	0,0	55	61,1
4	7,0	90	23	25,6 ^c	7	7,8	60	66,7
Sig					0,0001			

Từ bảng 1 cho thấy khi sử dụng HgCl_2 0,1% để khử trùng mẫu với thời gian khử trùng khác nhau đã có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tạo mẫu sạch (sig < 0,05). Khi khử trùng mẫu bằng HgCl_2 0,1% trong thời gian 4 - 5 phút cho tỉ lệ mẫu sạch thấp nhất (5,6 - 22,2%) và không xuất hiện mẫu sạch bị chết, nhưng có tỉ lệ mẫu nhiễm khá cao (77,8 - 94,4%). Khi tăng thời gian khử trùng mẫu bằng HgCl_2 0,1% lên 6 phút tỉ lệ mẫu sạch nảy chồi tăng lên đáng kể (đạt 38,9%), tỉ lệ mẫu sạch nảy chồi lại tiếp tục bị giảm khi tăng thời gian khử trùng 7 phút (tỉ lệ mẫu sạch đạt 25,6%). Một nghiên cứu khác về nhân giống *in vitro* cây Hồng tỉ muội (*Rosa chinensis* Jacq. Var. minima Redh.) kết quả cho thấy các đoạn đốt thân được khử trùng bằng dung dịch HgCl_2 0,2% trong thời gian 10 phút cho tỉ lệ mẫu

3.1. Tạo mẫu sạch và nuôi cấy khởi động

HgCl_2 nồng độ 0,1% đã được sử dụng để khử trùng mẫu với các thời gian khác nhau. Kết quả thu được sau 3 tuần nuôi cấy được thể hiện ở bảng 1 và hình 1a, 1b.

không nhiễm và sống sót đạt 71,67% (Nguyễn Ngọc Quỳnh Thơ và cộng sự, 2018), kết quả này có sự sai khác khá lớn với kết quả nghiên cứu của tác giả, điều này có thể do yếu tố loài và độ già của mẫu cây khi khử trùng. Như vậy, khi thời gian khử trùng mẫu cây bằng HgCl_2 0,1% quá lâu sẽ gây độc và làm chết mẫu, do đó để giảm mức độ nhiễm độc của mẫu cây, cần xử lý HgCl_2 0,1% trong vòng 6 phút cho hiệu quả tốt nhất (hình 1b).

3.2. Tái sinh chồi

Sau 3 tuần nuôi cấy ở giai đoạn tạo mẫu sạch, những mẫu sống khoẻ mạnh, không nhiễm nấm và khuẩn được lấy ra cắt bỏ phần gỗ bị đen ở 2 đầu, rồi cấy chuyển sang môi trường kích thích tái sinh chồi. Kết quả thu được sau 8 tuần cấy chuyển được thể hiện ở bảng 2 và hình 1c, 1d.

Bảng 2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi Hồng nhung cổ (sau 8 tuần nuôi cấy)

STT	BAP (mg/l)	Số mẫu cây	Số mẫu tái sinh	Tỉ lệ mẫu tái sinh (%)	Chiều cao chồi (cm)	Số chồi tái sinh/ nách lá (cái)	Chất lượng chồi
1	0,5	90	90	100	0,8 ^c	1,5 ^b	TB
2	1,0	90	90	100	1,5 ^b	1,6 ^b	Tốt
3	1,5	90	90	100	2,1 ^a	2,4 ^a	Tốt
4	2,0	90	90	100	0,9 ^c	1,3 ^b	TB
sig					0,0001	0,001	
LSD _{0,05}					0,32	0,34	

Số liệu ở bảng 2 cho thấy, các công thức thí nghiệm khác nhau đều cho 100% mẫu nảy chồi,

điều này chứng tỏ Hồng nhung cổ khả năng tái sinh chồi rất tốt. Mặc dù vậy, trong môi trường

nuôi cấy khi sử dụng BAP ở các nồng độ khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến chiều cao chồi, số chồi/nách lá ($\text{sig} < 0,05$) và chất lượng chồi. Khi bổ sung BAP từ 0,5 - 1,5 mg/l vào môi trường nuôi cấy làm tăng chiều cao chồi (từ 0,6 - 2,1 cm) và số chồi tái sinh/nách lá cũng tăng lên đáng kể (từ 1,5 - 2,4 chồi). Tiếp tục tăng nồng độ BAP đến 2,0 mg/l làm giảm chiều cao chồi (0,9 cm) và số chồi tái sinh cũng giảm (chỉ 1,3 chồi). Như vậy, công thức thích hợp nhất tái sinh chồi Hồng nhung cổ 1,5 mg/l BAP cho chiều cao chồi lớn nhất (đạt 2,1 cm) và 2,4 chồi tái sinh/nách lá, chất lượng chồi tốt (chồi xanh và mập) (hình 1c, 1d). Theo một số nghiên cứu khác về nhân giống *in vitro* hoa hồng để tạo chồi từ đốt thân Nguyễn Ngọc Quỳnh Thơ và cộng sự (2018) nghiên cứu cây Hoa hồng tỉ muội đã sử dụng môi trường MS có bổ sung 2 mg/l BA (benzyl adenine), 0,5 mg/l kinetin, 0,5 g/l than hoạt tính sau 21 ngày nuôi cấy, tỉ lệ bật chồi đạt 100%, số chồi đạt 3,6 chồi/mẫu, với

chiều cao trung bình của chồi là 2,2 cm. Một nghiên cứu khác của Bùi Thị Thu Hương và cộng sự (2017) trên Hoa hồng cổ sapa (*Rosa gallica* L.) sử dụng MS + 1,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin + 30 g/l sucrose với tỉ lệ bật chồi là 91,67%. Nghiên. Shirdel và cộng sự (2012) đối với loài *Rosa canina* L. cũng sử dụng môi trường MS bổ sung BAP (1mg/l) để tạo chồi từ đốt thân. Nosheen Hameed và cộng sự (2006) đã nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài *Rosa indica* L. cho thấy chồi non được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l BAP tỉ lệ mẫu tạo cụm chồi đạt 100% sau 7,4 ngày nuôi cấy. Hầu hết các kết quả nghiên cứu đều sử dụng BAP ở nồng độ khá cao (trên 1 mg/l BAP) để tái sinh chồi từ đốt thân và cho hiệu quả khá tốt.

3.3. Tạo cụm chồi

a) Ảnh hưởng của nồng độ BAP và Kinetin đến khả năng tạo cụm chồi

Kết quả thu được sau 8 tuần cấy chuyển được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Khả năng tạo cụm chồi của Hồng nhung cổ trong môi trường MS có bổ sung BAP và kinetin (sau 8 tuần nuôi cấy)

STT	Chất ĐHST (mg/l)		Tỉ lệ mẫu tạo cụm chồi (%)	Chiều cao chồi (cm)	Hệ số nhân chồi (lần)	Chất lượng chồi
	BAP	Kinetin				
1	0,5		75,6	1,8 ^c	2,3 ^c	Xấu
2	1,0	0,5	91,1	2,8 ^a	3,6 ^b	Tốt
3	1,5		87,8	2,6 ^{ab}	3,2 ^a	TB
4	2,0		86,7	2,3 ^b	2,9 ^b	TB
	sig		0,02	0,001	0,0001	
	LSD _{0,05}			0,27	0,40	

Kết quả phân tích thống kê cho thấy BAP và kinetin đã có ảnh hưởng rõ rệt đến tỉ lệ mẫu tạo cụm chồi, hệ số nhân chồi, chiều cao chồi cũng như chất lượng chồi ($\text{sig} < 0,05$). Khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy 0,5 mg/l BAP và 0,5 mg/l kinetin tỉ lệ mẫu tạo cụm chồi thấp (chỉ 76,6%) chồi phát triển chậm về chiều cao (1,8 cm), hệ số nhân chồi chỉ đạt 1,8 lần, chồi xấu (chồi nhỏ và hơi vàng). Khi tăng nồng độ BAP 1mg/l và 0,5 mg/kinetin tỉ lệ mẫu tạo cụm chồi, chiều cao chồi và hệ số nhân cũng tăng lên đáng kể (tương ứng đạt 91,1%, 2,8 cm và 3,6 chồi/mẫu) và chồi có chất lượng tốt (mập và xanh). Tiếp tục tăng nồng độ BAP (1,5 - 2 mg/l) + 0,5 mg/l kinetin khả năng nhân chồi cũng khá

tốt (tương ứng 86,7 - 87,8%, 2,3 - 2,6 cm và 2,9 - 3,2 lần) tuy nhiên chất lượng chồi phát triển chỉ ở mức độ trung bình (chồi nhỏ, lá xanh vàng) xuất hiện hiện tượng rụng lá trong chu kỳ nuôi. Nghiên cứu kết hợp BAP và kinetin trong giai đoạn nhân nhân nhanh chồi cũng được Attia và cộng sự (2012); Bùi Thị Thu Hương và cộng sự (2017) nghiên cứu và cho kết quả khá tốt, các tác giả cũng đã sử dụng công thức 1mg/lBAP + 1mg/l kinetin có hệ số nhân chồi đạt cao nhất trung bình (2,7 lần) đối với *Rosa canina* L. hay môi trường MS + 1,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin + 30 g/l sucrose với hệ số nhân là 2,48 chồi/mẫu đối với Hồng cổ sapa.

Như vậy, môi trường MS bổ sung BAP 1mg/l

và 0,5 mg/kinetin là tốt nhất trong các công thức nghiên cứu ở giai đoạn nhân nhanh chồi. Một số tác giả khác cũng kết hợp BAP, kinetin và NAA trong giai đoạn nhân chồi hồng nhưng, vì vậy, tiếp tục sử dụng công thức MS bổ sung BAP 1 mg/l và 0,5 mg/kinetin có kết hợp thêm với

NAA ở nồng độ khác nhau nhằm tìm hiểu thêm khả năng nhân chồi của Hồng nhung cổ.

b) Ảnh hưởng của nồng độ BAP, kinetin và NAA đến khả năng tạo cụm chồi

Kết quả thu được sau 8 tuần cây chuyển được thể hiện ở bảng 4 và hình 1e.

Bảng 4. Khả năng tạo cụm chồi của Hồng nhung cổ trong môi trường MS bổ sung BAP, kinetin và NAA (sau 8 tuần nuôi cấy)

STT	Chất ĐHST (mg/l)			Tỉ lệ mẫu tạo cụm chồi (%)	Chiều cao chồi (cm)	Hệ số nhân chồi (lần)	Chất lượng chồi
	NAA	BAP	Kinetin				
1	0,1			86,7	2,8 ^c	2,6 ^b	Tốt
2	0,3			94,4	4,1 ^a	3,9 ^a	Tốt
3	0,5	1,0	0,5	83,3	3,7 ^{ab}	3,3 ^{ab}	Tốt
4	0,7			87,8	3,4 ^b	3,1 ^{ab}	Tốt
	Sig			0,134	0,001	0,04	
	LSD _{0,05}				0,38	0,72	

Số liệu trong bảng 4 cho thấy bổ sung cả 3 chất điều hòa sinh trưởng BAP, kinetin và NAA vào môi trường nuôi cấy chồi đều có chất lượng tốt (chồi mập và xanh). Tỉ lệ mẫu tạo cụm chồi khá cao (từ 83,3 - 94,4%), chồi phát triển chiều cao (2,8 - 4,1 cm) và hệ số nhân chồi khá tốt (2,6 - 3,9 chồi/mẫu), đặc biệt khi bổ sung thêm NAA trong giai đoạn nhân chồi hiện tượng lá bị vàng và rụng không xuất hiện. Tác giả Nguyễn Văn Việt (2017) cũng nghiên cứu Hồng cổ sapa trên môi trường khoáng cơ bản WPM bổ sung 0,6 mg/l BAP + 0,4 mg/l kinetin + 0,2 mg/l NAA cho tỉ lệ mẫu tái sinh chồi và hệ số nhân chồi đạt cao nhất (93,56% và 4,23 lần). Hiệu quả nhân chồi khá tốt khi kết hợp 3 loại chất điều hòa sinh trưởng trên, tuy nhiên mỗi loài cây sẽ phù hợp

với một nồng độ khác nhau.

Như vậy, khi nghiên cứu ảnh hưởng của phối hợp 2 loại chất điều hòa sinh trưởng (BAP, kinetin) và nghiên cứu phối hợp 3 chất điều hòa sinh trưởng (BAP, kinetin và NAA) đã xác định được công thức BAP 1 mg/l + 0,5 mg/kinetin + 0,3 mg/l NAA cho hiệu quả nhân nhanh chồi tốt nhất (với tỉ lệ mẫu tạo cụm chồi đạt 94,4%, chiều cao chồi đạt 4,1 cm, hệ số nhân chồi đạt 3,9 lần) (hình 1e).

3.4. Tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh

Nghiên cứu khả năng ra rễ *in vitro* Hồng nhung cổ bằng cách sử dụng môi trường MS có bổ sung IBA ở các nồng độ khác nhau. Kết quả tạo rễ *in vitro* được thể hiện ở bảng 5 và hình 1f.

Bảng 5. Khả năng ra rễ của chồi *in vitro* Hồng nhung cổ trên môi trường MS bổ sung IBA ở nồng độ khác nhau (sau 2 tuần nuôi cấy)

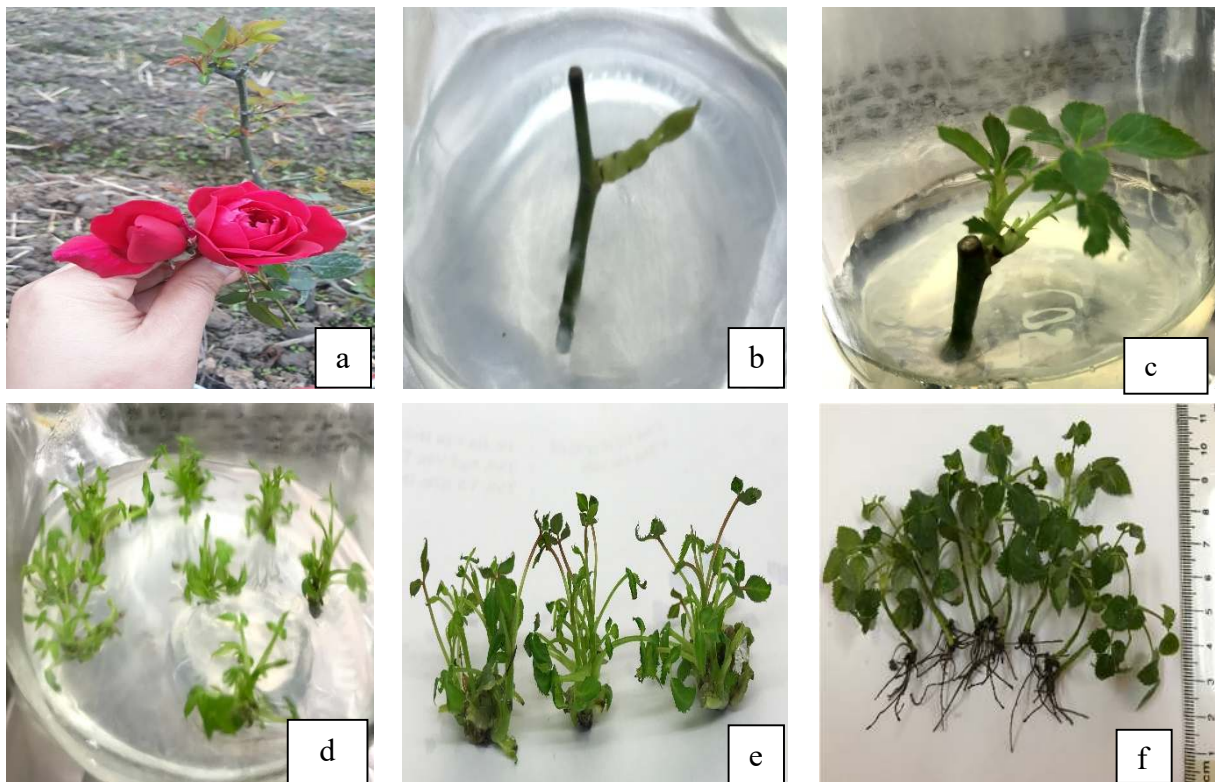
STT	IBA (mg/l)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số lượng rễ (cái)	Chiều dài rễ (cm)	Chất lượng rễ
1	0,3	77,8	2,8 ^c	2,2 ^d	TB
2	0,5	97,8	3,8 ^a	3,5 ^a	Tốt
3	1,0	91,1	3,2 ^b	2,9 ^{bc}	TB
4	1,5	85,6	2,9 ^{bc}	3,2 ^{ab}	TB
5	2,0	80,0	3,1 ^{bc}	2,7 ^c	xấu
	Sig		0,0001	0,015	0,016
	LSD _{0,05}		0,47	0,6	

Kết quả kiểm tra thống kê cho thấy có sai khác giữa các công thức thí nghiệm ở tất cả các chỉ tiêu như tỉ lệ chồi ra rễ, số rễ/cây, chiều dài

rễ (sig < 0,05). Bổ sung vào môi trường nuôi cấy 0,3 mg/l IBA cho hiệu quả ra rễ kém nhất (chỉ 77,8%, 2,8 rễ/cây và chiều dài rễ 2,2 cm). Tăng

nồng độ IBA 0,5 - 2 mg/l hiệu quả ra rễ tăng lên rõ rệt (với trên 80% chồi ra rễ, 2,9 - 3,8 rễ/cây, chiều dài rễ đạt 2,7 - 3,5 cm). Tuy nhiên, rễ ở công thức 2 mg/l IBA chất lượng kém, công thức 1 - 1,5 mg/l IBA chỉ ở mức độ trung bình, chất lượng rễ tốt nhất ở công thức 0,5 mg/l IBA. Một số kết quả nghiên cứu khác trong giai đoạn ra rễ các tác giả cũng sử dụng IBA để tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh, như Attia và cộng sự (2012) sử dụng môi trường MS bổ sung 2 mg/l IBA cho tỉ lệ ra rễ cao nhất (đạt 66,7%) trên loài *Rosa hybrida* L, hay tác giả Pegah Khosravi và cộng sự (2007) khi nghiên cứu cho loài *Rosa hybrida* chỉ sử dụng môi trường cơ bản VS dạng rắn

không bổ sung auxin với tỉ lệ chồi ra rễ cao nhất (93,33%) và số lượng rễ (4,45), tác giả Bùi Thị Thu Hương và cộng sự (2017) cũng không sử dụng chất điều hòa sinh trưởng trong môi trường ¼ MS để tạo rễ nhưng tỉ lệ mẫu ra rễ đạt 98,89%, số rễ trung bình là 3,36 rễ/cây, các rễ hình thành dài, mập sau 6 tuần nuôi cấy. Như vậy, khả năng ra rễ của hoa hồng rất khác nhau giữa các loài (có loài cần nồng độ auxin cao, có loài không cần sử dụng auxin trong môi trường nuôi cấy). Qua kết quả nghiên cứu giai đoạn ra rễ Hồng nhung cổ công thức MS + 0,5 mg/l IBA là phù hợp (hình 1f).



Hình 1. Quá trình nhân giống in vitro cây hoa hồng cổ

a. Hồng nhung cổ dùng để nhân giống; b. Mẫu chồi khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% bắt đầu này chồi sau 3 tuần; c-d. Chồi tái sinh trong môi trường MS + 1,5 mg/l BAP sau 8 tuần nuôi cấy; e. Cụm chồi phát triển trong môi trường MS + 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin + 0,3 mg/l NAA Sau 8 tuần nuôi cấy; f. Cây mô hoàn chỉnh trong môi trường MS + 0,5 mg/l IBA.

4. KẾT LUẬN

Công thức khử trùng hiệu quả nhất để tạo mẫu sạch cây Hồng nhung cổ từ chồi bằng cách lắc mẫu trong dung dịch $HgCl_2$ 0,1% trong 6 phút, tỉ lệ mẫu sạch nảy chồi đạt 38,9% sau 3 tuần nuôi cấy.

Môi trường thích hợp nhất tái sinh chồi cây Hồng nhung cổ là MS + 1,5 mg/l BAP, chiều

cao chồi lớn nhất (đạt 2,1 cm) và 2,4 chồi tái sinh/nách lá, chất lượng chồi tốt (chồi xanh và mập) sau 8 tuần nuôi cấy.

Môi trường MS + 1 mg/l BAP + 0,5 mg/kinetin + 0,3 NAA cho hiệu quả nhân nhanh chồi tốt nhất với tỉ lệ mẫu tạo cụm chồi đạt 94,4%, chiều cao chồi đạt 4,1 cm, hệ số nhân chồi đạt 3,9 lần sau 8 tuần nuôi cấy.

Môi trường tạo cây con hoàn chỉnh cho hiệu quả tốt nhất trong các công thức nghiên cứu là: MS 0,5 mg/l IBA với tỉ lệ chồi ra rễ đạt 97,8%, 3,8 rễ/chồi và rễ dài 3,5 cm, rễ có chất lượng tốt sau 2 tuần nuôi cấy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Thị Thu Hương, Đồng Huy Giới Nguyễn Thị Trang, Hồ Thị Quyên, 2017. Nhân nuôi cây Hoa hồng cổ sapa (*Rosa gallica* L) bằng kỹ thuật nuôi cấy mô *in vitro*. Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 7.

2. La Việt Hồng, Chu Đức Hà, Ngô Thị Quỳnh, 2019. Nhân giống cây Hoa hồng nhung Mê Linh - Hà Nội bằng phương pháp nuôi cấy mô. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái nguyên*, No.01/2019.

3. Nguyễn Ngọc Quỳnh Thơ, Nguyễn Duy Khánh, Huỳnh Thị Ánh Sang, Từ Văn Út, Trương Quỳnh Yên Yên, Nguyễn Thành Luân, Trịnh Thị Hương, 2018. Nghiên cứu tạo chồi *in vitro* loài cây Hoa hồng ti muội (*Rosa chinensis* Jacq. Var. *minima* Redh.), *Tạp chí Khoa học công nghệ và Thực phẩm* 15 (1) (2018) 57-64.

4. Nguyễn Văn Việt, 2017. Nghiên cứu nhân giống *in vitro* Hoa hồng cổ sapa (*Rosa sp.*) phục vụ bảo tồn và phát triển nguồn gen. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 322: 76-81.

5. Attia, EL Dessoky S. Dessoky, and Adel E. El-Tarras, 2012. *In vitro* propagation of *Rosa hybrida* L. cv. Al-Taif Rose plant. *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(48), pp. 10888-10893.

6. Nguyễn Hải Tuất, Nguyễn Trọng Bình (2005), *Khai thác và sử dụng SPSS để xử lý số liệu trong lâm nghiệp*, NXB Nông nghiệp.

7. Nosheen Hameed, Asad Shabbir, Aamir Ali and Rukhsana Bajwa, 2006. *In vitro* micropropagation of disease free rose (*Rosa indica* L.) *Mycopath*, 4(2): 35-38.

8. Shirdel, M., Motallebi-Azar, A. and Mahna, 2012. *In vitro* micropropagation of dog rose (*Rosa canina* L.). *Acta Hort.* 937, 911-913 DOI: 10.17660/ActaHortic.2012.937.112

9. Pegah Khosravi, Maryam Jafarkhani Kermani, Gorban Ali Nematzadeh, Mohammad Reza Bihanta, (2007). A protocol for mass production of *Rosa hybrida* cv. Iceberg through *in vitro* propagation. *Iranian journal of biotechnology*, Vol. 5, No. 2, April 2007.

RESEARCH ON *IN VITRO* PROPAGATION OF *Rosa sp.*

**Khuat Thi Hai Ninh¹, Nguyen Thi Tho¹, Kieu Tri Duc¹,
Nguyen The Huong¹, Ho Thi Xuan Hong¹**
¹*Vietnam National University of Forestry*

SUMMARY

Rosa sp. is one of the precious rose varieties in Vietnam producing a pleasant and comforting scent. Apart from being used for home decoration, it is also a good option for the distillation of essential oils that are used widely in cosmetic and pharmaceutical industries. Therefore, the *in vitro* propagation method is an effective way to produce disease-resistant offsets and provide a huge source of plantlets for plant material supply areas. The study on the technique of *in vitro* propagating of *Rosa sp.* shows that the most efficient formula in disinfection to produce disease-free offsets from shoots was using HgCl₂ 0.1% within 6 minutes with 38.9% of success after 3 weeks of *in vitro* propagation. The most suitable medium for vegetative regeneration from shoots was MS + 1.5 mg/l BAP. After 8 weeks of *in vitro* propagation, the highest young plant was 2.1 centimeters and 2.4 regenerative shoots per plant axil which were in good quality (green and big). The medium of MS + 1 mg/l BAP + 0.5 mg/kinetin + 0.3 NAA brought about the best propagating method whose percentage of creating groups of shoots was 94.4%, the height of young plant was 4.1 centimeters and the rate of shoot regeneration was 3.9 folds after 8 weeks of experiment. In MS + 0.5 mg/l IBA medium, the fully-formed young plants were produced with the rate of rooting was 97.8%, 3.8 roots per shoot, roots were 3.5 centimeters in length with high quality after 2 weeks of propagation. The successful *in vitro* propagating process would be applied into practice to produce more *Rosa sp.* young plantlets to meet the demand of markets.

Keywords: BAP, IBA, propagation, *Rosa sp.*, tissue culture.

Ngày nhận bài : 11/3/2021

Ngày phản biện : 22/4/2021

Ngày quyết định đăng : 12/5/2021