

BIẾN ĐỔI HÌNH THÁI VÀ SINH LÝ TRONG QUÁ TRÌNH PHÁT SINH CHỒI TỪ MẢNH LÁ CÂY CÚC HÀ LAN NUÔI CẤY *IN VITRO*

Trần Thanh Hương, Ngô Phước Hạnh, Phan Ngô Hoàng*

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên, Đại học Quốc gia TP. HCM

Email*: pnhoang@hcmus.edu.vn

Ngày gửi bài: 27.03.2013

Ngày chấp nhận: 21.08.2013

TÓM TẮT

Lá của cây cúc Hà Lan *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung α -NAA 1,5 mg/l và BA 0,5 mg/l nhằm cảm ứng sự tái sinh chồi. Ảnh hưởng của các vị trí lá trên cây trong sự tái sinh chồi được khảo sát. Các lá ở vị trí 3 và 4 cho khả năng thu nhân chồi cao nhất. Các biến đổi phát sinh hình thái chồi và vai trò của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh trong quá trình phát sinh chồi được phân tích. Mối liên hệ giữa vị trí lá trên cây, cường độ hô hấp của lá, các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh và sự tái sinh chồi được thảo luận. Các cây cúc từ sự phát sinh chồi đã tăng trưởng ổn định trên môi trường MS và phát triển tốt trong điều kiện phòng tăng trưởng.

Từ khóa: Chất điều hòa tăng trưởng thực vật, cúc Hà Lan, cường độ hô hấp, mô sẹo, sự phát sinh chồi.

Morphological and Physiological Alternative during Shoot Formation *in vitro* from Explants of *Chrysanthemum indicum* L.

ABSTRACT

Leaves from eight-week old *In vitro* plants of *Chrysanthemum indicum* L. were cultured on MS medium supplemented with 1.5mg/l α -NAA and 0.5mg/l BA to induce shoot regeneration. The influence of leaf position, 1th to 6th from shoot tip, on shoot regeneration was studied. The highest shoot number was obtained from 3th to 4th leaves. Morphological changes and the role of endogenous hormones in shoot regeneration were analyzed and relationship of leaf position, respiration rate, and endogenous hormone were also discussed. *In vitro* plants derived from leaf calli were developed on MS medium and transferred to pots to produce plantlets.

Keywords: Callus, *Chrysanthemum indicum* L., plant growth regulator, respiration rate, shoot regeneration.

1. MỞ ĐẦU

Cúc Hà Lan (*Chrysanthemum indicum* L.) là cây cho hoa đẹp du nhập vào Việt Nam từ rất lâu và được trồng phổ biến tại các khu vực ở Đà Lạt, Hải Phòng, Hà Nội. Chúng loại và sản lượng loài hoa đẹp này đã tăng dần theo thời gian cho đến thời điểm này. Hiện nay, việc nhân giống cây cúc Hà Lan thường được các trung tâm và nhà vườn thực hiện nhờ phương pháp giâm cành theo cách cổ điển hoặc sử dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* để nhân nhanh cụm chồi trực tiếp từ khúc cắt mang chồi ngủ. Thật ra, so với phương pháp giâm cành thì kỹ thuật nhân cụm chồi cũng đạt hiệu quả khá cao để có thể

tạo một lượng lớn cây con đáp ứng kịp thời nhu cầu trồng tại các vườn (Nguyễn Quang Thạch & cs., 2002; Zalewska, 2007). Tuy nhiên, kỹ thuật nhân giống cây cúc Hà Lan thông qua nuôi cấy khúc cắt chồi vẫn chưa thật sự đáp ứng đầy đủ nhu cầu số lượng và đặc biệt chất lượng giống trồng của thị trường. Trong khi đó, vi nhân giống theo quy mô công nghiệp (micropropagation) là tiềm năng phát triển của công nghệ sinh học thực vật, qua đó các loại giống trồng có thể được tạo ra một cách nhanh chóng và đồng nhất về chất lượng. Do vậy, việc khảo sát các biến đổi hình thái và sinh lý học trong quá trình phát sinh hình thái chồi từ hệ thống tế bào sinh dưỡng thông qua mô sẹo được

thực hiện nhằm đóng góp cơ sở khoa học cho khả năng ứng dụng cũng như thương mại hóa sản phẩm loại cây này trong tương lai.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Cây cúc Hà Lan *in vitro* 8 tuần tuổi nuôi cấy trên môi trường MS (Murashige & Skoog 1962), có chiều cao $6,5 \pm 0,5$ cm, mang từ 6 đến 8 lá.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định sự phát sinh chồi từ mô sẹo lá

Các lá cây cúc *in vitro* theo thứ tự từ 1 đến 6 tính từ chồi ngọn được cắt rời khỏi cuống. Dùng dao cấy tạo các vết thương ngang qua gân chính của lá và đặt nuôi trên môi trường MS hay MS có bổ sung α -NAA 1,5mg/l và BA 0,5mg/l. Sự nuôi cấy được thực hiện ở nhiệt độ $22 \pm 2^\circ\text{C}$, ánh sáng 3000 ± 200 lux (12/12), ẩm độ $65 \pm 5\%$. Số chồi phát sinh từ các lá ở những vị trí khác nhau được xác định sau 4 tuần nuôi cấy là giá trị trung bình của 5 lần lặp lại, mỗi lần 4 lá.

2.2.2. Phân tích sự thay đổi hình thái giải phẫu

Các biến đổi hình thái trong quá trình phát sinh chồi từ lá được theo dõi theo thời gian nhờ sự quan sát trực tiếp, dưới kính hiển vi soi nổi (Kruss SMZ 5600), hay kính hiển vi quang học (Kruss MBL 2100) sau sự cắt trên máy vi phẫu qua lá tại vùng phát sinh hình thái.

Các lá từ cây 8 tuần trên môi trường MS và các mảnh lá sau 2 hay 3 tuần nuôi cấy trên các môi trường phát sinh được cắt lát mỏng bằng máy vi phẫu, thực hiện theo quy trình: cố định mẫu trong dung dịch FAA (ethanol 70%: formalin: acid acetic với tỉ lệ 8:1:1 v/v). Sau 20 giờ, loại bỏ FAA bằng ethanol 70% rồi đặt lần lượt trong một chuỗi các dung dịch ethanol (nồng độ 70, 95 và 100%) và n-butanol để loại bỏ hoàn toàn nước trong mô. Sau đó, mẫu được vùi trong parafin tan ở 56°C (Merck) và cắt thành các lát mỏng 7 μm nhờ máy vi phẫu (Rotary microtome, Microm HM340E). Các lát mỏng parafin mang mẫu được dán trên lam nhờ dung

dịch gelatin 1%. Sự loại parafin được thực hiện nhờ các dung môi methylcyclohexan, cồn và nước cất (Lee et al., 1997). Cuối cùng, mẫu được nhuộm bằng phẩm nhuộm hai màu đỏ carmin – xanh iod.

2.2.3. Xác định diện tích, cường độ quang hợp và hô hấp của lá cây cúc *in vitro* 8 tuần tuổi

Diện tích của các lá ở vị trí 1 từ đến 6 của cây 8 tuần tuổi trên môi trường MS được xác định bằng cách chụp hình và phân tích nhờ phần mềm LIA for Win32 (LIA32).

Cường độ quang hợp và hô hấp của các lá được xác định bằng máy Hansatech ở 25°C với các mảnh lá có kích thước 10cm^2 . Cường độ quang hợp được xác định dưới ánh sáng 3.000 lux và trong tối đối với cường độ hô hấp. Kết quả thể hiện bằng lượng oxygen/đơn vị diện tích lá/giờ, số liệu trình bày là kết quả xử lý thống kê của 5 lần lặp lại.

2.2.4. Đo hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật

Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật: auxin (IAA), cytokinin (zeatin), gibberellin (GA_3) và acid abscisic (ABA) trong lá cây cúc *in vitro* 8 tuần hay các mẫu cấy lá nuôi cấy 3 tuần trên môi trường MS có α -NAA 1,5mg/l và BA 0,5mg/l được ly trích và cô lập bằng cách dùng các dung môi thích hợp và thực hiện sắc ký trên bản mỏng silicagel F₂₅₄ (mã số 1.05554, Merck), ở $30 \pm 1^\circ\text{C}$, với dung môi di chuyển cloroform:metanol: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 trực tiếp dưới UV 254nm so với vị trí IAA, zeatin, GA_3 và ABA tinh khiết (Yokota et al., 1980). Hoạt tính tương đương của các hormon tăng trưởng thực vật được xác định bằng sinh trắc nghiệm (Bùi Trang Việt, 1992; Meidner, 1984).

Sự thu nhận cây con *in vitro* và *in vivo*

Các chồi có nguồn gốc từ lá sau 6 tuần trên môi trường MS với α -NAA 1,5mg/l và BA 0,5mg/l được cô lập và chuyển vào trong các ống nghiệm chứa 10 ml môi trường MS với sacarose

30g/l và aga 6g/l. Sự nuôi cấy được thực hiện ở $22 \pm 2^\circ\text{C}$, ánh sáng 3000 ± 200 lux (12/12), ẩm độ $65 \pm 5\%$. Sau 8 tuần, các cây con *in vitro* khỏe mạnh với hệ thống thân, lá và rễ hoàn chỉnh được chuyển sang trồng trong các các hộp nhựa trên vật liệu đất trồng và xơ dừa (theo tỉ lệ 1:1) trong phòng tăng trưởng có điều kiện $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 3000 ± 200 lux (12/12) và ẩm độ $75 \pm 5\%$.

2.2.5. Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý thống kê bằng chương trình Statiscal Program Scientific System (SPSS) phiên bản 11.5 dùng cho Windows. Các số trung bình trong cột của bảng với các mẫu tự khác nhau đính kèm thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $P = 0,05$ (Võ Văn Huy và cs., 1997).

3. KẾT QUẢ

3.1. Diện tích, cường độ quang hợp và hô hấp của lá cây *in vitro*

Các lá ở các vị trí khác nhau có diện tích, cường độ quang hợp và hô hấp khác nhau. Cường độ quang hợp và hô hấp cao nhất ở lá thứ 3 và 4 tương ứng với vị trí lá đang tăng trưởng mạnh thể hiện thông qua diện tích các lá (Bảng 1).

3.2. Sự hình thành mô sẹo và phát sinh chồi

Sự hình thành mô sẹo được ghi nhận rất sớm, từ 10 – 14 ngày nuôi cấy trên môi trường MS với α -NAA 1,5mg/l và BA 0,5mg/l. Sau khoảng 16-18 ngày, có thể quan sát được các chồi xuất hiện tại mô sẹo dưới kính hiển vi soi nổi (Hình 1). Các chồi hoàn chỉnh được ghi nhận sau 3 tuần nuôi cấy (Hình 2). Nhìn chung, khả năng đáp ứng của các tế bào với môi trường nuôi cấy khác nhau tùy theo vị trí của lá trên cây, số

chồi hình thành trên lá 3 và 4 nhiều nhất sau 6 tuần nuôi cấy (Hình 3, 4; bảng 2).

Các phân tích hình thái và giải phẫu học cho thấy các tế bào mô sẹo hình thành từ các tế bào nhu mô dưới biểu bì, nhu mô libe hay tầng phát sinh libe - mộc (Hình 7, 8). Sự phát sinh chồi từ tế bào lá cây cúc có thể theo con đường phát sinh phôi hay phát sinh cơ quan. Sự thành lập phôi được cảm ứng từ nhóm tế bào mô sẹo có nguồn gốc từ biểu bì của lá, trong khi sự thành lập các trung tâm mô phân sinh được cảm ứng từ tế bào mô sẹo hình thành tại vùng tế bào libe hay nhu mô. Sự hiện diện của các phôi hình cầu cùng với sự hình thành các trung tâm mô phân sinh với kiểu tế bào đặc trưng (nhân to, tế bào chất đậm đặc...) xuất hiện sau 2-3 tuần nuôi cấy (Hình 9, 10, 11). Các trung tâm mô phân sinh tiếp tục phát triển thành các sơ khởi chồi (Hình 12).

3.3. Vai trò của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong sự phát sinh chồi từ mô sẹo lá

Hoạt tính IAA cao ở các lá (từ cây 8 tuần tuổi trên môi trường MS) từ 1 đến 4 và thấp hơn ở lá 5 và 6. Ngược lại, hoạt tính zeatin thấp nhất ở lá 1 và 2, cao hơn ở các lá từ 3 đến 6. Bên cạnh đó, tỉ lệ zeatin/IAA ở các nhóm lá tăng dần từ nhóm lá 1-2 đến nhóm lá 5-6 (Bảng 3).

Các mảnh lá nuôi cấy trên môi trường MS với α -NAA 1,5mg/l và BA 0,5mg/l sau 3 tuần có hoạt tính auxin và gibberllin giảm mạnh ở tất cả các vị trí lá nhưng tỉ lệ zeatin/IAA gia tăng rất mạnh, đặc biệt trong trường hợp vị trí lá 3-4, sự gia tăng tỉ lệ này đi cùng với sự phản phân hóa của các tế bào mô sẹo để hình thành chồi (Bảng 2, 3, 4).

Bảng 1. Diện tích, cường độ quang hợp và hô hấp của các lá cây cúc *in vitro* 8 tuần tuổi.

Vị trí lá trên cây	Diện tích lá (cm ²)	Cường độ quang hợp ($\mu\text{O}_2/\text{cm}^2$ lá/giờ)	Cường độ hô hấp ($\mu\text{O}_2/\text{mg TLT/giờ}$)
1	$0,83 \pm 0,02^d$	$0,04 \pm 0,00^c$	$0,04 \pm 0,02^c$
2	$1,13 \pm 0,03^c$	$0,07 \pm 0,01^{cb}$	$0,03 \pm 0,01^c$
3	$1,34 \pm 0,03^b$	$0,12 \pm 0,01^a$	$0,08 \pm 0,00^a$
4	$1,44 \pm 0,03^a$	$0,12 \pm 0,00^a$	$0,07 \pm 0,00^{ab}$
5	$1,32 \pm 0,06^b$	$0,10 \pm 0,02^{bc}$	$0,06 \pm 0,00^b$
6	$1,29 \pm 0,03^b$	$0,09 \pm 0,02^{bc}$	$0,04 \pm 0,00^c$



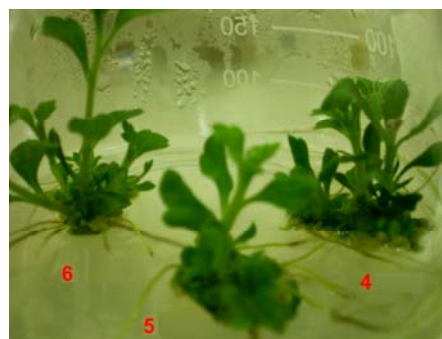
Hình 1. Mô sẹo lá trên môi trường MS với α -NAA 1,5mg/l và BA 0,5mg/l bắt đầu phát sinh tạo chồi, sau 16 ngày nuôi cấy



Hình 2. Chi tiết chồi phát sinh từ mô sẹo lá trên môi trường MS với α -NAA 1,5mg/l và BA 0,5mg/l, sau 3 tuần nuôi cấy



Hình 3. Chồi phát sinh từ mô sẹo các lá 1, 2 và 3 trên môi trường MS với α -NAA 1,5mg/l và BA 0,5mg/l, sau 6 tuần nuôi cấy



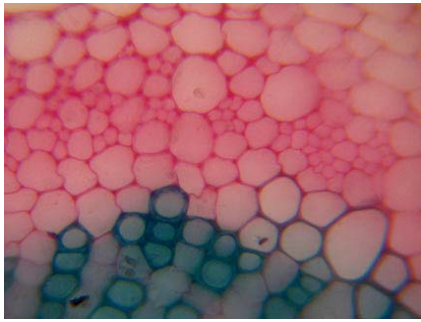
Hình 4. Chồi phát sinh từ mô sẹo các lá 4, 5 và 6 trên môi trường MS với α -NAA 1,5mg/l và BA 0,5mg/l, sau 6 tuần nuôi cấy



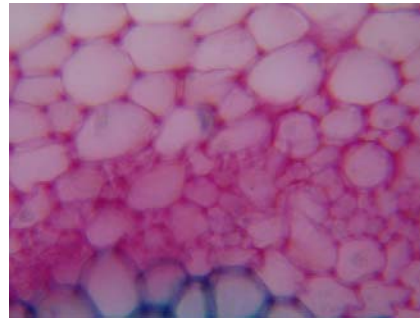
Hình 5. Các cây cúc *in vitro* 8 tuần tuổi có nguồn gốc từ mô sẹo lá tăng trưởng trên môi trường MS



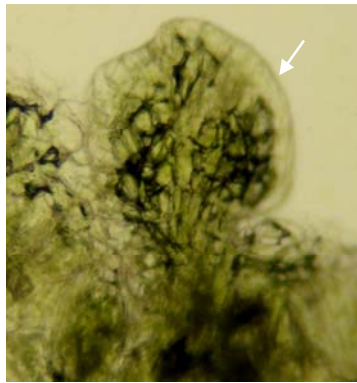
Hình 6. Cây cúc có nguồn gốc từ mô sẹo lá sau 2 tuần chuyển trồng trên đất trong phòng tăng trưởng



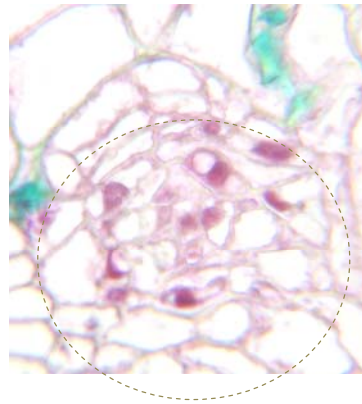
Hình 7. Lát cắt ngang qua vùng gân lá cây cúc *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS



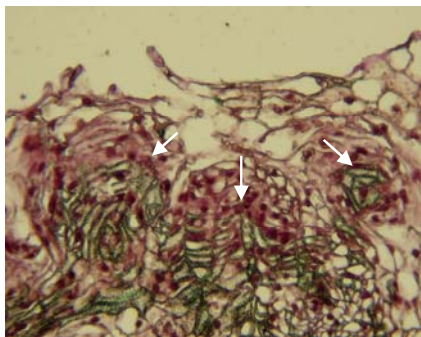
Hình 8. Lát cắt ngang qua vùng tạo mô sẹo của lá cúc sau 2 tuần nuôi cấy trên môi trường MS với NAA 1,5mg/l và BA 0,5mg/l



Hình 9. Sự thành lập phôi soma trên môi trường MS với α -NAA 1,5mg/l và BA 0,5mg/l, sau 3 tuần nuôi cấy



Hình 10. Sự hình thành trung tâm mô phân sinh ngọn chồi trên môi trường MS với α -NAA 1,5mg/l và BA 0,5mg/l, sau 3 tuần nuôi cấy



Hình 11. Các trung tâm mô phân sinh ngọn chồi hình thành trên môi trường MS với α -NAA 1,5mg/l và BA 0,5mg/l, sau 3 tuần nuôi cấy



Hình 12. Chồi với các phác thể lá hình thành từ mẫu cấy lá trên môi trường MS với α -NAA 1,5mg/l và BA 0,5mg/l, sau 3 tuần nuôi cấy

Bảng 2. Số chồi phát sinh từ lá ở các vị trí khác nhau trên môi trường MS có α -NAA 1,5mg/l và BA 0,5mg/l sau 4 tuần nuôi cấy

Vị trí lá trên cây	Số chồi phát sinh/cm ² lá
1	10,57 ± 1,23 ^d
2	14,53 ± 1,60 ^{cd}
3	23,23 ± 2,19 ^a
4	24,20 ± 1,90 ^a
5	21,30 ± 1,38 ^{ab}
6	18,08 ± 1,58 ^{bc}

Bảng 3. Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh của lá cây cúc *in vitro* 8 tuần tuổi

Nhóm lá	Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật (mg/l)				Tỉ lệ zeatin/IAA
	IAA	Zeatin	GA ₃	ABA	
1 - 2	1,24 ± 0,08 ^a	0,87 ± 0,15 ^b	0,79 ± 0,17 ^a	0,22 ± 0,02 ^b	0,70
3 - 4	1,16 ± 0,03 ^a	1,14 ± 0,26 ^a	0,68 ± 0,15 ^{ab}	0,25 ± 0,03 ^{ab}	0,98
5 - 6	1,01 ± 0,05 ^b	1,24 ± 0,18 ^a	0,58 ± 0,04 ^c	0,3 ± 0,03 ^a	1,23

Bảng 4. Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh của mẫu cây lá trên môi trường MS với α -NAA 1,5mg/l và BA 0,5mg/l, sau 3 tuần

Nhóm lá	Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật (mg/l)				Tỉ lệ zeatin/IAA
	IAA	Zeatin	GA ₃	ABA	
1 - 2	0,33 ± 0,01 ^a	0,54 ± 0,07 ^b	0,09 ± 0,01 ^a	0,53 ± 0,07 ^a	1,64
3 - 4	0,24 ± 0,03 ^b	1,55 ± 0,10 ^a	0,03 ± 0,01 ^c	0,14 ± 0,02 ^c	6,46
5 - 6	0,16 ± 0,05 ^c	0,56 ± 0,10 ^b	0,04 ± 0,01 ^b	0,41 ± 0,05 ^{ab}	3,50

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số mang các chữ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức $P=0,05$

3.4. Sự thu nhận cây *in vitro* và *in vivo*

Sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS, các cây con có nguồn gốc phát sinh từ lá tăng trưởng và phát triển thành những cây con hoàn chỉnh với đầy đủ hệ thống rễ thân lá (Hình 5). Các cây con phát triển khỏe mạnh sau 2 tuần chuyển sang điều kiện phòng tăng trưởng (Hình 6).

4. THẢO LUẬN

Vị trí các lá trên cây thể hiện mức độ tăng trưởng khác nhau trong cùng điều kiện nuôi cấy. Ở các lá đang tăng trưởng, sự phân chia tế bào diễn ra mạnh mẽ cần các sản phẩm hữu cơ được tạo ra thông qua quá trình biến dưỡng và

sự cung cấp năng lượng ATP tạo ra từ quá trình hô hấp (Taiz and Zeiger, 2005). Sự gia tăng khả năng quang hợp và hô hấp của các lá từ vị trí 1 đến 4 tương ứng với mức độ tăng trưởng của các lá tăng dần. Hoạt động hô hấp của nhóm lá ở vị trí 3 và 4 cao tương ứng với sự hiện diện của IAA và zeatin trong các lá này cao hơn.

Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh thuộc nhóm kích thích IAA và zeatin cao trong các lá đã giúp cho các tế bào đáp ứng dễ dàng hơn với các chất điều hòa tăng trưởng thực vật ngoại sinh trong môi trường để cảm ứng sự hình thành tế bào mô sẹo từ tế bào biểu bì, libe, nhu mô hay tượng tầng libe mộc. Theo Del Pozo et al. (2004) và Litwack (2005),

cytokinin và auxin cũng như tỉ lệ cytokinin/auxin có vai trò kích thích sự tăng trưởng và phân chia tế bào để phát sinh một hình thái mới. Ở các lá trước khi đặt cấy, tỉ lệ zeatin/IAA cao tương đương 1 ở nhóm lá 3-4 là điều kiện thuận lợi cho sự hình thành mô sẹo diễn ra mạnh mẽ hơn so với các lá ở vị trí 1-2 hay 5-6. Trên môi trường nuôi cấy có α -NAA 1,5mg/l và BA 0,5mg/l, sự phát sinh chồi diễn ra đồng thời với sự thay đổi tỉ lệ zeatin/IAA nội sinh theo chiều hướng tăng. Đặc biệt, những lá ở vị trí 3-4 hoạt tính IAA giảm nhẹ nhưng hoạt tính zeatin tăng cao đã dẫn đến tỉ lệ zeatin/IAA gia tăng rất mạnh, chính sự gia tăng tỉ lệ này đã kích thích các tế bào mô sẹo phân hóa để hình thành phôi hay chồi với số lượng chồi xuất hiện cao nhất ở các mảnh lá tại vị trí này. Số lượng chồi phát sinh trong quá trình nuôi cấy mô sẹo lá đạt được trong nghiên cứu này khoảng 23-25 chồi/cm² lá, hiệu suất đạt được khá cao so với nuôi cấy chồi nách đã được công bố trước đó của Zalewska et al. (2007).

Ngoài ra, sự hình thành phôi được cảm ứng từ các tế bào mô sẹo có nguồn gốc từ tế bào biểu bì lá trong khi sự hình thành các trung tâm mô phân sinh chồi được cảm ứng bởi các tế bào mô sẹo hình thành các tế bào nhu mô, libe hay tượng tầng libe mộc. Các trung tâm mô phân sinh với các tế bào đặc trưng tăng trưởng và phân chia mạnh mẽ để hình thành các chồi con sau 3 tuần nuôi cấy. Các cây con có nguồn gốc từ quá trình phát sinh chồi này tăng trưởng ổn định trong điều kiện *in vitro*; trong phòng tăng trưởng, các cây con có nguồn gốc từ sự nuôi cấy này tăng trưởng khá ổn định. Kết quả nghiên cứu cho thấy hệ thống nuôi cấy này có thể ứng dụng rộng rãi nhằm đáp ứng nhu cầu giống trồng cho nhà vườn cũng như các trung tâm sản xuất theo quy mô công nghiệp.

5. KẾT LUẬN

Sự phát sinh hình thái chồi từ lá cây cúc Hà Lan trải qua 2 giai đoạn: (1) hoạt hóa tế bào để tạo mô sẹo cần vật liệu nuôi cấy có hoạt động

sinh lý mạnh (cường độ hô hấp cao, hoạt tính zeatin và IAA nội sinh cao với tỉ lệ tương đương 1) và môi trường nuôi cấy thích hợp (MS có bổ sung α -NAA 1,5mg/l và BA 0,5mg/l); (2) chồi phát sinh chồi đi cùng với tỉ lệ zeatin/IAA cao. Các lá ở vị trí 3 và 4 có khả năng cho số chồi cao nhất sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung α -NAA 1,5mg/l và BA 0,5mg/l.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bùi Trang Việt (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.). Tập san khoa học ĐH. Tổng hợp TP.HCM, (1): 155-165.
- Del Pozo J.C., Lopez-Matas M.A., Ramirez-Parra E. and Gutierrez C. (2005). Hormonal control of the plant cell cycle. *Plant Physiol.* (123): 173-183.
- Lee K.S., Zapata-Arias F.J., Brunner H. and Afza R. (1997). Histology of somatic embryo initiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* spp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, (51): 1-8.
- Litwack G. (2005). *Plant hormone. Vitamins and Hormones.* Elsevier Inc. (72): 1-544.
- Meidner H. (1984). *Class Experiments in Plant Physiology.* George Allen and Unwin (London).
- Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol*, 15(3): 473-497.
- Nguyễn Quang Thạch và Đặng Văn Đông (2002). *Cây hoa Cúc và kỹ thuật trồng.* Nxb Kỹ thuật
- Taiz L. and Zeiger (2005). *Plant physiology.* The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Võ Văn Huy, Võ Thị Lan và Hoàng Trọng (1997). *Ứng dụng SPSS for windows để xử lý và phân tích dữ kiện nghiên cứu.* Nxb. Khoa học kỹ thuật, 195 trang.
- Yokota T., Murofushi N., Takahashi N. (1980). Extraction, purification, and identification, Hormonal regulation of development. Part I Molecular aspects of plant hormones, Edited by J. MacMillan - Encyclopedia of plant physiology, New series, Sringer New York. (9): 113-201.
- Zalewska M., Lema-Rumin'ska J., and Miler N. (2007). *In vitro* propagation using adventitious buds technique as a source of new variability in *Chrysanthemum* sp. *Scientia Horticulturae*, (113): 70-73.