

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự nhân nhanh chồi *in vitro* lan Thạch hộc thiết bì (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)

- Lê Thị Diễm
- Võ Thị Bạch Mai

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 03 tháng 08 năm 2016, nhận đăng ngày 20 tháng June năm 2017)

TÓM TẮT

Lan Dendrobium officinale Kimura et Migo (Thạch hộc thiết bì) được biết đến từ rất lâu là giống lan quý, sử dụng làm thuốc và thực phẩm chức năng đang được thương mại hóa rộng rãi trên thế giới. Việc nhân giống bằng đoạn thân mang mầm cho hiệu quả nhân giống cao, phẩm chất cây giống tốt và đồng đều. Có thể nhân giống với số lượng lớn trong một khoảng thời gian ngắn. Kết quả nghiên cứu cho thấy đoạn thân mang mầm ngủ nuôi cấy trên môi trường MS (Murashige và Skoog) + 25 g sucrose + 10 % nước dừa + 0,5 mg/L BA (N^6 benzyl amino purin) + 6 g/L agar là môi trường cho tỉ lệ tạo chồi cao.

Từ khóa: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo, Thạch hộc Thiết bì, nhân giống, cụm chồi

MỞ ĐẦU

Thạch hộc thiết bì còn được gọi là Thạch hộc tía (*Dendrobium officinale*) là một trong những loài lan rừng thuộc chi *Dendrobium*, vừa là cây làm cảnh vừa là cây làm thuốc quý hiếm, đã được đưa vào công ước quốc tế về động thực vật hoang dã có nguy cơ tuyệt chủng. Thạch hộc tía có tên khoa học *Dendrobium officinale* Kimura et Migo, thuộc chi Thạch hộc, họ Lan (Orchidaceae), phân bố tự nhiên chủ yếu ở vùng rừng có độ cao 1.000–3.400 m so với mặt biển. Trong chi Thạch hộc có nhiều loài dùng để làm thuốc quý. Ở Trung Quốc, chi Thạch hộc có 14 loài và 12 loài phụ, trong đó chỉ có 11 loài làm thuốc quý nhưng Thạch hộc tía là loại làm thuốc tốt nhất [1].

Các chồi này được sử dụng để nuôi cấy cụm chồi cho mục đích nâng cao hệ số nhân giống. Sự hình thành cụm chồi tốt nhất trên môi trường nuôi cấy MS + BA 2,0 mg/L + NAA (Naphthalene acetic acid) 0,4 mg/L; MS + kinetin 1,5 mg/L + NAA 0,3 mg/L; MS + TDZ (Thidiazuron) 2,0 mg/L + NAA 0,4 mg/L; MS + adenin 1,5 mg/L + NAA 0,3 mg/L. Tuy nhiên, trên môi trường bổ sung kinetin hoặc TDZ thì cần phải thực hiện bước cấy chuyển để kéo dài chồi sau 45 ngày nuôi cấy. Môi trường tốt nhất cho giai đoạn tạo rễ là MS + NAA 0,5 mg/L.

Về mặt y học, Thạch hộc tía có nhiều tác dụng như chống ung thư, chống lão hóa, tăng sức đề kháng của cơ thể, chữa bệnh tiểu đường, tăng huyết áp [2]. Về mặt dinh dưỡng, Thạch hộc tía có giá trị độc đáo và công năng bảo vệ sức khỏe, sản phẩm bổ dưỡng từ lâu đời và đã được sử dụng làm thực phẩm. Thạch hộc tía giàu polysaccharide, alkaloid, các amino acid và nhiều chất khoáng kalium, calcium, magnesium, đồng, titan và nhiều nguyên tố vi lượng. Ngoài ra, Thạch hộc thiết bì còn có những hợp chất đặc thù như phenanthryn, bibenzyl, ketone, ester và các chất nhầy, hợp chất amidon [1].

Do nhu cầu ngày càng tăng của thị trường cho mục đích làm dược liệu phục vụ cho con

người, việc khai thác ngoài tự nhiên một thời gian dài đã làm cạn kiệt nguồn nguyên liệu quý giá này [3]. Hơn nữa, hầu hết các bộ phận của cây lan Thạch học tía đều được sử dụng làm dược liệu nên sau mỗi đợt thu hoạch cần một lượng lớn cây giống để trồng mới lại. Với các phương pháp nhân giống vô tính ngoài tự nhiên và các phương pháp nhân giống truyền thống có hệ số nhân giống thấp, cây giống không đồng đều, ảnh hưởng lớn đến năng suất cũng như chất lượng sản phẩm. Vì vậy việc chọn lọc và tạo nguồn giống *in vitro* để đáp ứng nhu cầu của thị trường là việc làm hết sức cần thiết.

Với mục tiêu tạo ra nguồn cây giống đạt chất lượng cao, đồng đều, số lượng lớn, chúng tôi đề xuất thực hiện nghiên cứu đề tài này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

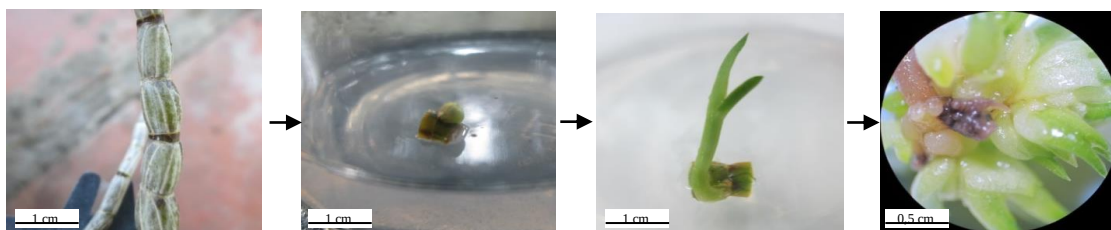
Vật liệu

Cây lan Thạch học tía (*Dendrobium officinale* Kimura Et Migo) trồng tại quận Hóc

Môn, Tp. Hồ Chí Minh được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu.

Khử trùng mẫu vật

Mẫu vật *in vivo* được rửa sạch dưới vòi nước chảy sau đó lắc nhẹ với xà phòng, rửa lại nhiều lần với nước cất vô trùng. Trong tủ cấy vô trùng lắc nhẹ mẫu vật với cồn 70 % khoảng 5 phút. Loại bỏ bao lá kèm bên ngoài và các phần phụ bị tổn thương, rửa sạch bằng nước cất vô trùng nhiều lần, tiếp theo xử lý mẫu vật bằng dung dịch Javel thương phẩm (NaOCl 5 %) và 3 giọt Tween 20 lắc trong 10 phút, sau đó lắc với dung dịch HgCl₂ 0,1 % 5 phút, rửa sạch nhiều lần bằng nước cất vô trùng. Mẫu vật sau khi được khử trùng, cắt thành từng đoạn có kích thước còn khoảng 0,8–1 cm với mỗi khúc cắt có mang mầm ngủ. Sau đó, nuôi cấy trên các môi trường thích hợp cho sự nảy chồi. Các chồi này sẽ được sử dụng làm nguồn vật liệu cho các thí nghiệm tiếp theo (Hình 1).



Hình 1. Sự hình thành chồi in vitro tạo nguồn vật liệu ban đầu

Nuôi cấy *in vitro* mầm ngủ trên thân cây lan Thạch học tía

Môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự nảy chồi của khúc cắt thân mang mầm ngủ là môi trường: MS bổ sung 1,0 mg/L BA và 10 % nước dừa (Hình 1).

Nuôi cấy *in vitro* chồi cây lan Thạch học tía

Thí nghiệm 1: Môi trường MS có bổ sung BA (mg/L) kết hợp với NAA (mg/L) ở các nồng độ khác nhau, đồng thời bổ sung 0,3 g/L than hoạt tính và 10 % nước dừa.

Thí nghiệm 2: Môi trường MS có bổ sung kinetin (mg/L) kết hợp với NAA (mg/L) ở các nồng độ khác nhau, đồng thời bổ sung 0,3 g/L than hoạt tính và 10 % nước dừa.

Thí nghiệm 3: Môi trường MS có bổ sung TDZ (mg/L) kết hợp với NAA (mg/L) ở các nồng độ khác nhau, đồng thời bổ sung 0,3 g/L than hoạt tính và 10 % nước dừa.

Thí nghiệm 4: Môi trường MS có bổ sung adenin (mg/L) kết hợp với NAA (mg/L) ở các nồng độ khác nhau, đồng thời bổ sung 0,3 g/L than hoạt tính và 10 % nước dừa.

Thí nghiệm 5: Sự phát triển của rễ lan Thạch học tía nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung NAA (mg/L) ở các nồng độ khác nhau.

Các mô cấy được đặt ngoài sáng trong phòng nuôi có nhiệt độ $27 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm $55 \pm 10\%$, ánh sáng 2000 ± 20 lux. Tỷ lệ mẫu phát triển, số lá của chồi và sự xuất hiện của chồi bên được ghi nhận sau 8 tuần nuôi cấy.

Quan sát hình thái giải phẫu

Khúc cắt thân mang mầm ngủ sau 1 tuần và 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS và môi trường có bổ sung các chất điều hòa tăng trưởng được cắt theo chiều dọc và theo chiều ngang, nhuộm hai màu đỏ carmin - xanh iod, quan sát dưới kính hiển vi và chụp ảnh.

Xử lý số liệu

Các số liệu ghi nhận được xử lý thống kê bằng phần mềm StatGraphics Plus 3.0. Sự sai biệt có ý nghĩa ở mức $p = 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

Khử trùng mẫu vật tạo nguồn vật liệu ban đầu

Mẫu vật *in vivo* dùng để nuôi cấy được khử trùng bằng dung dịch HgCl_2 0,1% hoặc dung dịch Javel thương phẩm (NaOCl 5%) hoặc dung dịch HgCl_2 0,1% kết hợp với dung dịch Javel thương phẩm (NaOCl 5%) và 3 giọt Tween 20 ở các thời gian khử trùng khác nhau. Kết quả sau 1 tuần nuôi cấy, ở nồng độ HgCl_2 0,1%, thời gian khử trùng 13 phút cho tỷ lệ mẫu sống và không bị nhiễm cao nhất so với các thời gian còn lại.

Ảnh hưởng của chất điều hòa tăng trưởng thực vật lên nuôi cấy *in vitro* chồi lan Thạch học tía

Thí nghiệm 1: Sự nuôi cấy *in vitro* chồi lan Thạch học tía trên môi trường MS có bổ sung BA (mg/L) kết hợp với NAA (mg/L) ở các nồng độ khác nhau

Sau 10 ngày nuôi cấy, khúc cắt chồi *in vitro* đã có cảm ứng hình thành chồi trên các môi trường, sau 30 ngày đã có sự hình thành cụm chồi (Bảng 1).

Bảng 1. Sự phát triển của cụm chồi lan Thạch học tía nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA; BA kết hợp NAA và than hoạt tính 0,2 g/L

Nghiem thức	Tỷ lệ chồi sống và tái sinh (%)	Số chồi trung bình
MS	100	10,55 ^{de}
MS + BA 1,0 mg/L	100	17,33 ^{cd}
MS + BA 1,5 mg/L	100	10,06 ^{de}
MS + BA 2,0 mg/L	100	7,17 ^e
MS + BA 3,0 mg/L	100	4,44 ^e
MS + BA 0,5 mg/L + NAA 0,1 mg/L	100	19,66 ^c
MS + BA 1,0 mg/L + NAA 0,2 mg/L	100	21,44 ^{bc}
MS + BA 1,5 mg/L + NAA 0,3 mg/L	100	28,11 ^b
MS + BA 2,0 mg/L + NAA 0,4 mg/L	100	38,11^a
MS + BA 3,0 mg/L + NAA 0,5 mg/L	100	8,44 ^e

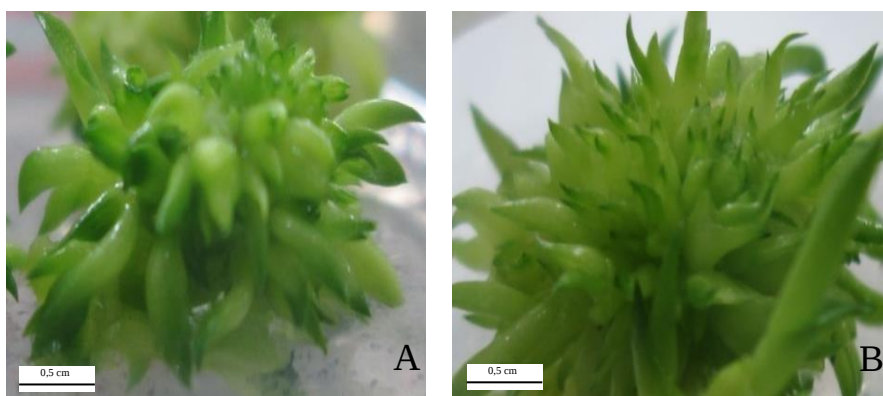
Trên môi trường có bổ sung BA, sự hình thành chồi tốt nhất trên môi trường MS + BA 1,0 mg/L, chồi phát triển đồng đều có màu xanh

đậm, chồi to khỏe. Tuy nhiên, khi BA tăng cao hơn thì số chồi trên mỗi cụm giảm, chồi chậm phát triển, chồi mập và ngắn, lá dày có màu xanh

đậm (Hình 2). Cytokinin thúc đẩy sự trưởng thành của diệp lạp và là nhân tố chính điều khiển quá trình tái sinh mạnh [4]. Cytokinin cần cho giai đoạn cảm ứng tạo chồi nhưng kìm hãm sự kéo dài của chồi.

Sự phối hợp của auxin và cytokinin thúc đẩy sự biệt hóa chồi tốt hơn khi sử dụng đơn lẻ cũng được báo cáo trong nghiên cứu của Dake Zhao và cộng sự trên *Dendrobium wangliangii* [9]. Kết quả nghiên cứu cho thấy trên môi trường MS có bổ sung kết hợp BA và NAA thì 100 % mẫu hình thành cụm chồi và có số chồi trung bình cao hơn

trên môi trường có bổ sung BA riêng lẻ ở hầu hết các nghiệm thức (Bảng 1, Hình 2A). Môi trường MS có bổ sung BA 2 mg/L + NAA 0,4 mg/L các mẫu cấy phát triển tốt cho tỉ lệ tái sinh chồi là cao nhất sau 45 ngày nuôi cấy với số chồi trung bình là 38,11 chồi (Bảng 1, Hình 2B). Các nghiệm thức còn lại có hệ số nhân chồi thấp hơn tuy nhiên vẫn cao hơn so với nghiệm thức đối chứng. Khi tăng dần nồng độ BA và NAA sự hình thành chồi ban đầu tăng lên, chồi tăng trưởng tốt và khá đồng đều.



Hình 2. Sự phát triển của cụm chồi lan Thạch học tía A: MS + BA 1,0 mg/L; B: MS + BA 2,0 mg/L + NAA 0,4 mg/L

Thí nghiệm 2: Sự phát triển của cụm chồi lan Thạch học tía nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung kinetin (mg/L) kết hợp với NAA (mg/L) ở các nồng độ khác nhau

Bảng 2. Sự phát triển của cụm chồi lan Thạch học tía nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung kết hợp kinetin, NAA và than hoạt tính 0,2 g/L

Nghiem thức	Tỉ lệ chồi sống và tái sinh (%)	Số chồi trung bình
MS	100	6,11 ^d
MS + kinetin 0,5 mg/L	100	4,77 ^d
MS + kinetin 1,0 mg/L	100	15,33 ^c
MS + kinetin 1,5 mg/L	100	5,11 ^d
MS + kinetin 2,0 mg/L	100	4,66 ^d
MS + kinetin 0,5 mg/L + NAA 0,1 mg/L	100	17,77 ^c
MS + kinetin 1,0 mg/L + NAA 0,2 mg/L	100	23,77 ^b
MS + kinetin 1,5 mg/L + NAA 0,3 mg/L	100	42,77^a
MS + kinetin 2,0 mg/L + NAA 0,4 mg/L	100	25,77 ^b
MS + kinetin 3,0 mg/L + NAA 0,5 mg/L	100	16,66 ^c

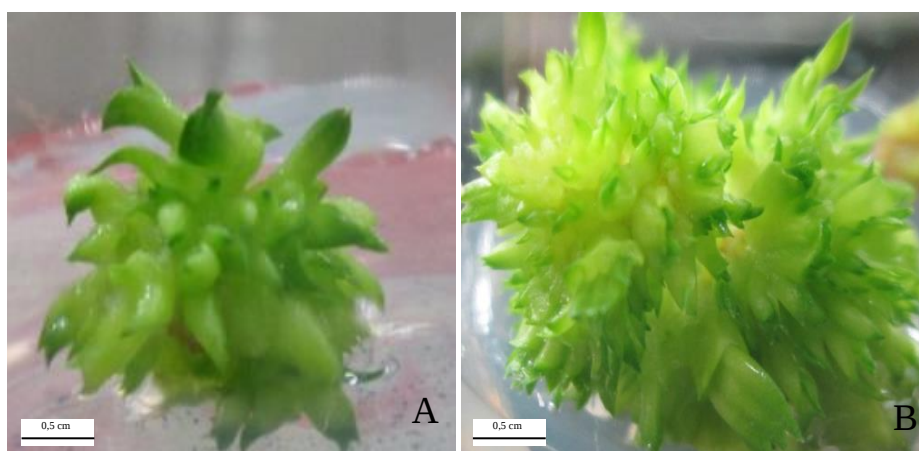
Kinetin cảm ứng trực tiếp sự hình thành chồi từ lát mỏng tế bào [5]. Trong thí nghiệm này thì kinetin cũng thúc đẩy sự hình thành cụm chồi từ chồi *in vitro* sau 20 ngày nuôi cấy. Trên môi trường có kinetin riêng lẻ thì tỉ lệ tạo chồi tốt nhất trên môi trường kinetin 1,0 mg/L với số chồi trung bình 15,33 chồi (Bảng 2, Hình 3A). Tuy nhiên, khi nồng độ kinetin > 1,0 mg/L thì số chồi trên mỗi cụm bắt đầu giảm và số chồi trung bình thấp hơn so với đối chứng, chồi mảnh, có hiện tượng thủy tinh thể và có sự hình thành PLB (Bảng 3).

Cytokinin ở nồng độ thấp kích thích sự phát triển của chồi nách, nồng độ cao sẽ cảm ứng hình thành chồi bất định nhưng chồi rất khó ra rễ.

Kết quả khảo sát cho thấy dưới ảnh hưởng của kinetin và NAA, sau 45 ngày nuôi cấy, các chồi đều phát triển tốt. Đặc biệt, trên môi trường có bổ sung kinetin 1,5 mg/L + NAA 0,3 mg/L kích thích sự phát triển của các chồi (Bảng 2, Hình 3B). Cytokinin làm thuận lợi cho quá trình phân nhánh của chồi cây thân thảo. Trong sự phát sinh cơ quan, sự phối hợp giữa auxin và

cytokinin với một tỉ lệ hợp lý sẽ cho hiệu quả tạo chồi hoặc tạo rễ [6].

Bổ sung kết hợp kinetin và NAA vào môi trường nuôi cấy cho hiệu quả nhân chồi khá rõ ràng. Sự phối hợp của kinetin và NAA ở tất cả các nồng độ khảo sát đều thúc đẩy gia tăng hệ số nhân chồi và đều cao hơn so với nghiệm thức đối chứng (Bảng 2, Hình 3B). Nghiên cứu của Peng Zhao và cộng sự cũng đã sử dụng kết hợp kinetin và NAA cho mục đích tái sinh chồi trực tiếp từ lát mỏng tế bào trên đối tượng *Dendrobium candidum* Wall Ex Lindl [7]. Nghiên cứu này cũng cho thấy BA thúc đẩy sự hình thành chồi trực tiếp từ lát mỏng tế bào tốt hơn kinetin. Tuy nhiên, sự hình thành chồi bắt đầu giảm khi gia tăng dần nồng độ kinetin và NAA (Bảng 2). Nghiên cứu của Paromik Bhattacharyya và cộng sự năm 2015 cũng cho thấy khi gia tăng kinetin 3,0 mg/L thì có sự giảm số chồi trên mỗi mảnh cấy trên lan *Dendrobium thyrsiflorum* [8]. Bên cạnh sự hình thành chồi, kết quả nghiên cứu cũng cho thấy khi gia tăng nồng độ kinetin và NAA thì chồi bắt đầu có hiện tượng thủy tinh thể.



Hình 3. Sự phát triển chồi lan Thạch học tía. A: MS + kinetin 1,0 mg/L; B: MS + TDZ 1,5 mg/L + NAA 0,3 mg/L

Thí nghiệm 3: Sự phát triển của cụm chồi lan Thạch học tía nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung TDZ (mg/L) kết hợp với NAA (mg/L) ở các nồng độ khác nhau

TDZ (thidiazuron) được xem là một cytokinin tổng hợp có hoạt tính mạnh đã được ứng dụng phổ biến cho nhiều đối tượng trong nghiên cứu cũng như nhiều quá trình sinh lý khác nhau của thực vật, làm thuận lợi cho quá trình

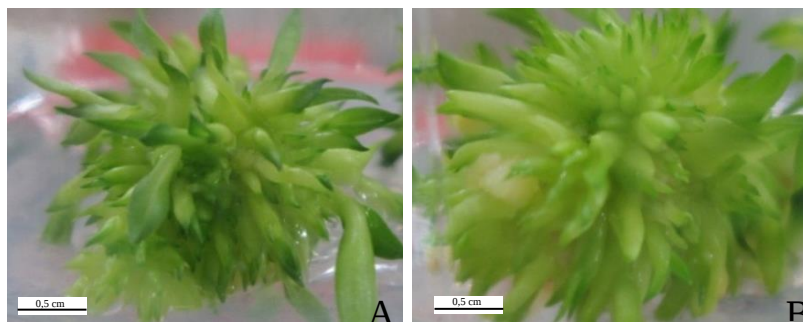
phân nhánh của chồi cây thân thảo [6]. Kết quả thí nghiệm cho thấy khi sử dụng các loại TDZ khác nhau về loại và nồng độ xử lý thì dẫn đến kết quả thúc đẩy hoặc ức chế sự hình thành chồi là khác nhau. TDZ xử lý riêng lẻ cho hiệu quả kích thích tạo chồi là tốt nhất khi nồng độ 1,0 mg/L, trung bình là 39,21 chồi. Tuy nhiên, nhiều chồi có kích thước ngắn và có sự hình thành PLB (Bảng 3, Hình 4A).

Bảng 3. Sự phát triển của cụm chồi lan Thạch học tía nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung kết hợp TDZ (mg/L), NAA (mg/L) và than hoạt tính 0,2 g/L

Nghiệm thức	Tỉ lệ chồi sống và tái sinh (%)	Số chồi trung bình
MS	100	6,46 ^e
MS + TDZ 0,5 mg/L	100	20,77 ^{cd}
MS + TDZ 1,0 mg/L	100	39,21 ^b
MS + TDZ 1,5 mg/L	100	19,88 ^{cd}
MS + TDZ 2,0 mg/L	100	8,35 ^e
MS + TDZ 0,5 mg/L + NAA 0,1 mg/L	100	18,10 ^d
MS + TDZ 1,0 mg/L + NAA 0,2 mg/L	100	24,88 ^{bcd}
MS + TDZ 1,5 mg/L + NAA 0,3 mg/L	100	26,10 ^{bc}
MS + TDZ 2,0 mg/L + NAA 0,4 mg/L	90	51,11^a
MS + TDZ 3,0 mg/L + NAA 0,5 mg/L	75	18,55 ^d

TDZ có vai trò trong cảm ứng sự hình thành chồi bất định, tùy vào nồng độ sử dụng mà hiệu quả cảm ứng khác nhau [8]. Trong thí nghiệm này chúng tôi khảo sát vai trò của TDZ phối hợp NAA trong quá trình tạo chồi TDZ kích thích tạo chồi ở *Phalaenopsis delatanii* hiệu quả hơn BA hoặc zeatin, với 75 % tạo cụm chồi trên môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/L TDZ sau 30 ngày [5]. Sự kết hợp giữa NAA và TDZ thúc đẩy sự hình thành chồi và làm tăng hệ số nhân chồi. Kết quả thí nghiệm cho thấy TDZ cùng với NAA ở nồng độ thích hợp thúc đẩy cho sự hình thành chồi ở tất cả các nghiệm thức xử lý phối hợp. Môi trường MS + TDZ 2,0 mg/L + NAA 0,4 mg/L cho tỉ lệ tạo chồi là cao nhất trung bình là 51,11 chồi (Bảng 3, Hình 4B).

Nghiên cứu của Dake Zhao và cộng sự năm 2013, trên *Dendrobium wangliangii* cho thấy TDZ kích thích tạo chồi hiệu quả hơn BA [9]. Tuy nhiên, TDZ là một cytokinin mạnh, có hiệu quả kích thích tạo chồi tối ưu ở một nồng độ nhất định, khi sử dụng nồng độ cao sẽ gây hiệu ứng ức chế. Kết quả thí nghiệm của chúng tôi cũng thể hiện khá rõ điều này. Khi tăng dần nồng độ của TDZ 3,0 mg/L thì tỉ lệ hình thành chồi giảm rất đáng kể và số chồi hình thành không có khác biệt so với nghiệm thức đối chứng điều này đồng nghĩa với việc TDZ không còn hiệu quả gây kích thích tạo chồi khi ở nồng độ cao (Bảng 3). Ngoài ra chúng tôi cũng ghi nhận thêm rằng khi tăng nồng độ TDZ và NAA, chồi ngắn và có sự hình thành PLB. Ngoài ra khi tăng dần nồng độ TDZ và NAA làm giảm tỉ lệ sống của mẫu cấy (Bảng 3).



Hình 4. Sự phát triển của cụm chồi lan Thạch học tía. A: MS + TDZ 1,0 mg/L; B: MS + TDZ 2,0 mg/L + NAA 0,4 mg/L

Thí nghiệm 4: Sự phát triển của cụm chồi lan Thạch học tía nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung adenin (mg/L) kết hợp với NAA (mg/L) ở các nồng độ khác nhau

Phần lớn cytokinin trong cây hoặc cytokinin tổng hợp đều là dẫn xuất của adenin [6]. Trong thí nghiệm này, xử lý adenin nồng độ 1,0 mg/L thì thúc đẩy sự hình thành chồi với số chồi trung

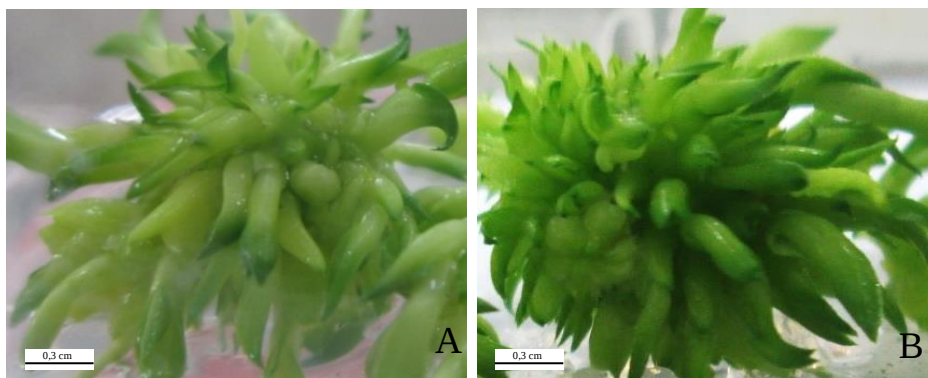
bình là 14,88 chồi, số chồi trên mỗi cụm cao hơn so với đối chứng và cao hơn các nghiệm thức còn lại. Chồi khỏe, tăng trưởng nhanh và có màu xanh đậm (Bảng 4, Hình 5A). Tuy nhiên, khi nồng độ adenin lớn hơn 1,0 mg/L thì có sự ức chế hình thành chồi, chồi ngắn, màu xanh đậm và có sự hình thành PLB.

Bảng 4. Sự phát triển của cụm chồi lan Thạch học tía nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung kết hợp adenin (mg/L), NAA (mg/L)

Nghiệm thức	Tỉ lệ chồi sống và tái sinh (%)	Số chồi trung bình
MS	100	5,66 ^{ef}
MS + adenin 0,5 mg/L	100	13,55 ^{bcd}
MS + adenin 1,0 mg/L	100	14,88 ^{bc}
MS + adenin 1,5 mg/L	100	10,88 ^{cde}
MS + adenin 2,0 mg/L	100	5,66 ^{ef}
MS + adenin 0,5 mg/L + NAA 0,1 mg/L	100	8,66 ^{def}
MS + adenin 1,0 mg/L + NAA 0,2 mg/L	100	16,55 ^b
MS + adenin 1,5 mg/L + NAA 0,3 mg/L	100	33,33^a
MS + adenin 2,0 mg/L + NAA 0,4 mg/L	100	16,77 ^b
MS + adenin 3,0 mg/L + NAA 0,5 mg/L	100	4,77 ^f

Khi khảo sát vai trò của adenin phối hợp NAA trong quá trình tạo chồi, kết quả cho thấy adenin kết hợp với NAA ở nồng độ thích hợp thúc đẩy cho sự hình thành chồi, cụ thể là trên môi trường MS + adenin 1,5 mg/L + NAA 0,3 mg/L cho tỉ lệ tạo chồi là cao nhất trung bình là 33,33 chồi (Bảng 4, Hình 5B). Khi tăng dần nồng độ của adenin và NAA thì tỉ lệ hình thành chồi giảm rất đáng kể và số chồi trung bình không có khác biệt so với nghiệm thức đối chứng. Điều

này cho thấy adenin kích thích sự hình thành chồi trong một khoảng nồng độ thích hợp và cần có sự phối hợp với NAA. Hơn nữa, chúng tôi cũng ghi nhận rằng trong giai đoạn đầu của sự cảm ứng tạo chồi, adenin kích thích chồi hình thành và tăng trưởng nhanh, chồi phát triển tốt và có màu xanh đậm nhưng khi tăng nồng độ adenin tăng cao thì có sự giảm hình thành chồi nhưng không có sự hình thành PLB.



Hình 5. Sự phát triển của cụm chồi lan Thạch học tía. C: MS + adenin 1,0 mg/L ; D: MS + adenin 1,5 mg/L + NAA 0,3 mg/L

Quan sát hình thái giải phẫu chồi



Hình 6. Khúc cắt thân mang mầm ngủ được nuôi trên môi trường 0,5 mg/L BA. A, B, C: chồi được cảm ứng sau 5, 15, 20 ngày nuôi cấy trên môi trường nhân chồi

Thí nghiệm 5: Sự phát triển của rễ lan Thạch học tía nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung NAA (mg/L) ở các nồng độ khác nhau

Auxin hoạt hóa sự phân bào, sinh trưởng kéo dài, cần cho sự tạo mạch dẫn và ra rễ [4]. Việc sử dụng auxin cảm ứng tạo rễ được nghiên cứu và ứng dụng rất phổ biến trên nhiều đối tượng nghiên cứu. Tuy nhiên loại và nồng độ auxin còn tùy thuộc vào từng đối tượng mà sử dụng phù

hợp. Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng NAA cho giai đoạn ra rễ. Kết quả cho thấy khi gia tăng dần nồng độ NAA thì 100% cây đều cảm ứng tạo rễ. Số rễ cao trên môi trường MS + NAA 0,3; 0,5; 0,7 và 1,0 mg/L tuy không có khác biệt ý nghĩa thống kê ở các nghiệm thức này, nhưng đều có sự khác biệt so với nghiệm thức đối chứng (Bảng 5, Hình 6). Để giảm chi phí trong nhân giống nên chọn NAA 0,5 mg/L.

Bảng 5. Sự phát triển của rễ lan Thạch học tía nuôi cấy trên môi trường MS có NAA (mg/L) ở những nồng độ khác nhau

Nghiệm thức	Tỉ lệ chồi tạo rễ (%)	Số rễ trung bình /chồi
MS	100	1,7 ^b
MS + NAA 0,3 mg/L	100	3,9 ^a
MS + NAA 0,5 mg/L	100	4,9 ^a
MS + NAA 0,7 mg/L	100	4,8 ^a
MS + NAA 1,0 mg/L	100	4,6 ^a



Hình 7. Sự phát triển của rễ lan Thạch học tía nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/L NAA và than hoạt tính 0,3 g/L

KẾT LUẬN

Dung dịch khử trùng HgCl_2 0,1 % kết hợp với dung dịch javel thương phẩm (NaOCl 5 %) cho hiệu quả khử trùng tốt nhất với 40 % mẫu sống sót. Môi trường tốt cho mầm ngủ phát triển từ đốt thân là MS bổ sung 1,0 mg/L BA và 10 % nước dừa. Môi trường MS bổ sung BA 2,0 mg/L + NAA 0,4 mg/L, thích hợp cho sự tái sinh chồi từ khúc cắt chồi *in vitro* với 100 % mẫu phát sinh chồi và số chồi tái sinh trên mỗi mẫu là 38,11. Môi trường MS bổ sung kinetin 1,5 mg/L + NAA 0,3 mg/L thích hợp cho sự phát sinh chồi từ khúc cắt chồi *in vitro* với khả năng tái sinh chồi 100 %, số chồi tái sinh trên mỗi mẫu là

42,77. Chồi khỏe phát triển tốt thích hợp cho giai đoạn ra rễ. Môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L adenin + NAA 0,3 mg/L thích hợp cho sự phát sinh chồi từ khúc cắt chồi *in vitro* với sự tái sinh chồi tốt với 100 % và số chồi tái sinh trên mỗi mẫu là 33,33. Môi trường MS bổ sung TDZ 2,0 mg/L + NAA 0,4 mg/L thích hợp cho sự tái sinh chồi với số chồi trung bình là 51,11. Trên môi trường này tỉ lệ tái sinh chồi đạt 90 %, và số chồi hình thành trên mỗi cụm tuy cao nhưng chồi ngắn có màu xanh nhạt, lá phát triển bất thường. Môi trường MS bổ sung NAA 0,5 mg/L tạo rễ tốt từ chồi con cây lan Thạch học tía.

Influence of plant growth regulators on the rapid propagation buds of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

- Le Thi Diem
- Vo Thi Bach Mai

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Dendrobium officinale Kimura et Migo has been known for a long time as a precious orchid, which is used for medicine and functional foods that are widely commercialized in the world. The nodal explants could be obtained in high efficiency, good quality and uniform seedlings on

multiplication vegetative *in vitro*. They can be propagated in large quantities in a short time. The studied results showed that the nodal explants grew on MS medium + 10 % coconut milk + 25 g sucrose + 0.5 mg/L BA + 6 g agar/liter create high buds. This buds were used to

create bud clusters with the aim of improving *in vitro* vegetative. The best bud culture medium for the formation of clusters was MS + BA 2.0 mg/L + NAA 0.4 mg/L; MS + kinetin 1.5 mg/L + NAA 0.3 mg/L; MS + TDZ 2.0 mg/L + NAA 0.4 mg/L;

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo, multiplication, *in vitro*, buds

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. W. Wei, F. Lei, B.W. Rong, M.D. Lung, L.C. Hang, S. Ping, H.Q. Bin, Structure characterization and immunomodulating effects of polysaccharides isolated from *Dendrobium officinale*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 9–45 (2016).
- [2]. N.T. Sơn và cs, Nhân giống *in vitro* lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (Thạch học thiết bị). *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 8, 12, 1247–1282 (2014).
- [3]. Q. Xin, W. Caixia, O. Tong, T. Min, *In vitro* flowering and fruiting in culture of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (Orchidaceae). *Pak. J. Bot.*, 46, 5, 1877–1882 (2014).
- [4]. B.T. Việt, Sinh lý thực vật đại cương, Phần II: Phát triển, NXB Đại Học Quốc Gia Thành Phố Hồ Chí Minh (2000).
- [5]. D.T. Nhựt và cs, Nghiên cứu khả năng nhân nhanh protocorm like body của cây hoa địa lan (*Cymbidium sp.*) bằng hệ thống bioreactor tự tạo, *Kỹ yếu hội nghị khoa học* MS + adenine 1.5 mg/L + NAA 0.3 mg/L. However, the addition of kinetin or TDZ to the culture medium needed a steps to extend the bud subculture after 45 days in culture. The best medium for the rooting is MS + NAA 0.5 mg/L.
- [6]. Công nghệ sinh học thực vật trong công tác nhân giống và chọn tạo giống hoa, NXB Nông nghiệp (2007).
- [7]. V.T.B. Mai, Sự phát triển chồi và rễ, Nxb. Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh (2004).
- [8]. P. Zhao, W. Wang, F.S. Feng, F. Wu, Z.Q. Yang, W.J. Wang, Highfrequency shoot regeneration through transverse thin cell layer culture in *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl, *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 90, 131–139 (2007).
- [9]. B. Bakul, S.M.S. Islam, Effects of plant growth regulators on multiple shoot induction in *Vanda tessellata* (Roxb.) Hook. Ex G.Don an endangered medicinal orchid. *International Journal of Science and Nature*, 5, 4, 707–712 (2014).
- [10]. Z. Dake, H. Guangwan, C. Zhiying, S. Yana, Z. Li, T. Anjun, L. Chunlin, Micropropagation and *in vitro* flowering of *Dendrobium wangliangii*: A critically endangered medicinal orchid. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7 (28): 2098–2110 (2013).