

SỬ DỤNG KỸ THUẬT NUÔI CÂY IN VITRO ĐỂ NGHIÊN CỨU SỰ PHÁT TRIỂN CỦA PHÁT HOA DENDROBIUM SONIA

Trịnh Cẩm Tú, Bùi Trang Việt

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM.

(Bài nhận ngày 13 tháng 03 năm 2006, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 27 tháng 07 năm 2006)

TÓM TẮT: Sự ra hoa của *Dendrobium* sp. liên quan đến sự chuyển tiếp mô phân sinh dinh dưỡng tạo lá và thân sang mô phân sinh sinh dục tạo hoa. Mô phân sinh hoa tự là vị trí phát sinh cơ quan liên tục với một vùng nhỏ các tế bào gốc đa năng. Đời sống và hoạt động của mô phân sinh hoa tự liên quan đến số nụ hoa trên phát hoa được quan sát bằng cách sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh hoa tự trên môi trường Ma có bổ sung zeatin 1mg/l, AIA 0,5mg/l và GA₃ 1mg/l. Với BA 5mg/l, mô phân sinh hoa tự của phát hoa tạo cụm chồi dinh dưỡng thay vì tiếp tục tạo phát hoa. Vai trò của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trên đời sống và số lượng hoa được thảo luận.

Từ khóa: chất điều hòa tăng trưởng thực vật, *Dendrobium*, mô phân sinh hoa tự, ra hoa

1. MỞ ĐẦU

Ở nhiều vườn lan tại Thành phố Hồ Chí Minh, *Dendrobium* sp. chỉ cho phát hoa với khoảng 6-7 nụ hoa. Trong một nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã chứng minh AIA giúp sự hình thành hệ thống mạch bên dưới mô phân sinh hoa tự, BA giúp nụ tận cùng chậm héo và GA₃ giúp kéo dài lông của trục phát hoa (Trịnh Cẩm Tú và cộng sự 2002). Các biến đổi hình thái của mô phân sinh hoa tự hay mô phân sinh hoa cũng như các biến đổi sinh lý học trong sự chuyển tiếp ra hoa được sự quan tâm đặc biệt của các nhà khảo cứu (King và Evans 2003, Sobry và cộng sự 2005).

Trong công trình này, sau khi quan sát sự biến đổi mô phân sinh hoa tự trong sự thành lập phát hoa *Dendrobium*, chúng tôi tiến hành nuôi cấy mô phân sinh hoa tự với mục đích tìm hiểu khả năng duy trì hoạt động (kéo dài đời sống) của mô phân sinh hoa tự và qua đó làm gia tăng số nụ hoa trên phát hoa.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Phát hoa *Dendrobium* sp. ở các giai đoạn phát triển:

- Giai đoạn 1: phát hoa thành lập sau 3-5 ngày (chiều dài 1-3 cm)
- Giai đoạn 2: phát hoa thành lập sau 11-13 ngày (chiều dài 10-13 cm)
- Giai đoạn 3: phát hoa thành lập sau 30-32 ngày (chiều dài 28-32 cm)

2.2 Phương pháp

2.2.1. Quan sát hình thái giải phẫu

Các lát cắt dọc (dày 7μm) qua mô phân sinh hoa tự nhờ máy vi phẫu được nhuộm hai màu (carmin, iod) và quan sát dưới kính hiển vi.

2.2.2. Nuôi cấy khúc cắt phát hoa trên môi trường đặc

Các khúc cắt (khoảng 2cm) ở các vị trí đốt 1-4 (tính từ gốc phát hoa) được đặt trên môi trường Ma (Chatelet 1992) có bổ sung AIA 0,1; 0,5mg/l, zeatin 0,5; 1 mg/l, GA₃ 0,5; 1mg/l

hoặc BA 5mg/l. Ở các vị trí này, khi quan sát dưới kính hiển vi chúng tôi ghi nhận đột thân không mang mô phân sinh hoa tự hay mô phân sinh hoa ở vảy lá.

2.2.3. Nuôi cấy mô phân sinh hoa tự trên môi trường đặc

Mô phân sinh hoa tự ở vị trí số 8, kích thước 200-300 μ m được cô lập từ phát hoa ở 3 giai đoạn phát triển của phát hoa và được đặt trên môi trường Ma có bổ sung AIA 0,5 mg/l, zeatin 0; 0,5; 1 và 2 mg/l (riêng rẽ hoặc kết hợp). Tỷ lệ khúc cắt không bị hóa nâu (còn sống và hoạt động) được quan sát.

2.2.4. Nuôi cấy mô phân sinh hoa tự trong môi trường lỏng

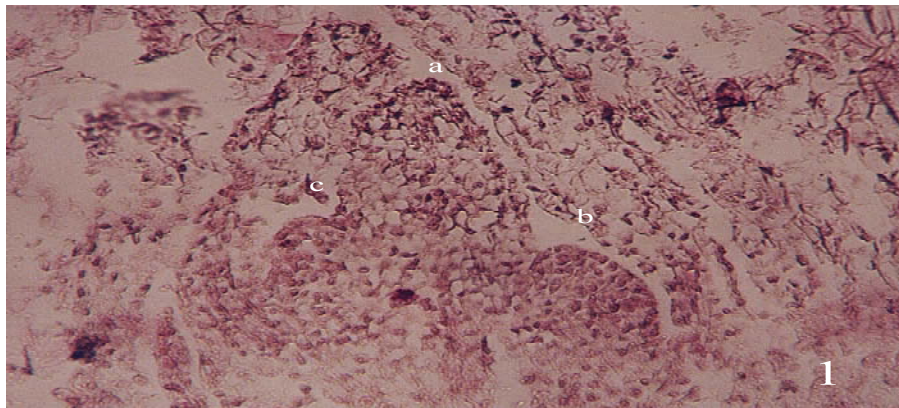
Mô phân sinh hoa tự ở vị trí số 8, kích thước 200-300 μ m được cô lập từ phát hoa ở giai đoạn 2 và được đặt vào Erlen 50ml chứa 5ml môi trường Ma lỏng với zeatin 1mg/l kết hợp AIA 0,1; 0,5 mg/l hay với GA₃ 1mg/l (lắc liên tục với tốc độ 80 vòng/phút).

Sự nuôi cấy *in vitro* được thực hiện ở các điều kiện chiếu sáng 2500lux $\pm$ 500lux, 12 giờ/ngày, nhiệt độ 28⁰C $\pm$ 2⁰C, ẩm độ 55% $\pm$ 5%. Các thí nghiệm nuôi cấy *in vitro* được lặp lại 3 lần, mỗi lần 4 mẫu cấy.

3. KẾT QUẢ

3.1 Hoạt động của mô phân sinh hoa tự trong sự phát triển của phát hoa

Ở giai đoạn 1 của phát hoa, mô phân sinh hoa tự gần giống mô phân sinh dinh dưỡng với đỉnh nhọn và các phác thể lá bắc. Trẻ hơn trong giai đoạn 1, ở nách của các lá bắc đầu tiên đã xuất hiện các mô phân sinh hoa (hình 1). Giai đoạn 1 kéo dài khoảng 10 ngày.



Hình 1. Mô phân sinh hoa tự ở giai đoạn 1 của phát hoa (a), với các sơ khởi nụ hoa 1 (b) và 2 (c)

Ở giai đoạn 2 của phát hoa, mô phân sinh hoa tự hoạt động mạnh, phát hoa kéo dài, số nụ tăng. Cuối giai đoạn này, phát hoa đã có khoảng 5 nụ hoa; các mô phân sinh hoa mới nhất (gần bên dưới mô phân sinh hoa tự) xuất hiện từ vùng ngoại vi của mô phân sinh hoa tự. Giai đoạn 2 kéo dài khoảng 15 ngày.

Ở giai đoạn 3, phát hoa thường đã có khoảng 5 nụ hoa hoàn chỉnh và 2 sơ khởi hoa đang phân hóa. Đỉnh ngọn (gồm mô phân sinh hoa tự và hai sơ khởi hoa tận cùng ngay bên dưới mô phân sinh hoa tự) đã hướng ngang theo cách đặc sắc và thường không tiếp tục phát triển. Sau sự hướng ngang này, mô phân sinh hoa tự và các nụ hoa non nhất héo và chết, trong khi trục phát hoa tiếp tục kéo dài, các nụ hoa xuất hiện trước tiếp tục phân hóa và tăng trưởng. Giai đoạn 3 kéo dài khoảng 8 ngày.

3.2 Sự tạo mới phát hoa thứ cấp từ khúc cắt phát hoa

Sau 2 tuần nuôi cấy, khúc cắt phát hoa (ở vị trí 1-4) hoàn toàn không tạo được mô phân sinh hoa tự trên các môi trường có AIA 0,5 mg/l, zeatin 0,5; 1mg/l hoặc GA₃ 0,5; 1mg/l.

Tuy nhiên, trên môi trường có BA 5 mg/l, mô phân sinh hoa tự được cảm ứng (ở tuần 2) và tiếp tục phát triển thành phát hoa ở tỉ lệ khức cắt tạo mới phát hoa là $55\% \pm 0,3\%$ sau 4 tuần. Các phát hoa được tạo mới này cho những nụ hoa đầu tiên sau 8 tuần.

3.3 Nuôi cấy mô phân sinh hoa tự trên môi trường đặc

Sau 2 tuần nuôi cấy, mô phân sinh hoa tự ở giai đoạn 3 hóa nâu và không tiếp tục phát triển. Tuy nhiên, mô phân sinh hoa tự ở giai đoạn 1 và 2 vẫn phát triển tốt trên môi trường có bổ sung AIA 0,5mg/l và zeatin 2mg/l cho tới sau 4 tuần nuôi cấy (bảng 1). Mô phân sinh hoa tự ở giai đoạn 2 khi được nuôi cấy trên môi trường này tạo cụm chồi dinh dưỡng thay vì phát hoa (hình 2).



Hình 2. Mô phân sinh hoa tự *Dendrobium* sp. ở giai đoạn 2 của phát hoa sau 4 tuần trên môi trường Ma bổ sung zeatin 2mg/l và AIA 0,5mg/l



Hình 3. Mô phân sinh hoa tự *Dendrobium* sp. ở giai đoạn 2 của phát hoa sau 4 tuần trên môi trường Ma bổ sung AIA 0,5mg/l, zeatin 1mg/l và GA_3 1mg/l

Bảng 1. Tỉ lệ sống (số mẫu không bị hóa nâu trên 4 mẫu nuôi cấy) của mô phân sinh hoa tự ở các giai đoạn phát triển của phát hoa trên môi trường Ma có bổ sung chất điều hòa tăng trưởng thực vật

Xử lý	Tuần 2			Tuần 4		
	Giai đoạn phát triển của phát hoa					
	1	2	3	1	2	3

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

3.4 Nuôi cấy mô phân sinh hoa tự trên môi trường lỏng

Sau 4 tuần nuôi cấy, mô phân sinh hoa tự ở cuối giai đoạn 2 ngừng tăng trưởng trong môi trường Ma không hormon trong khi trong môi trường Ma có bổ sung AIA 0,5mg/l và zeatin 1mg/l GA₃ 1mg/l mô phân sinh hoa tự hoạt động mạnh để kéo dài trực phát hoa và cho nhiều mô phân sinh hoa (bảng 2, hình 3). Mô phân sinh hoa tự ở cuối giai đoạn 2 được nuôi cấy trong môi trường có auxin và cytokinin có thể kéo dài đời sống đến trên 8 tuần.

Bảng 2. Sự hoạt động của mô phân sinh hoa tự ở cuối giai đoạn 2 sau 4 tuần nuôi cấy trên các môi trường Ma lỏng có bổ sung chất điều hòa tăng trưởng thực vật

Xử lý	Chiều dài phát hoa <i>in vitro</i> (mm)	Số mô phân sinh hoa tự được thành lập
Chuẩn (không hormon)	2,40 ± 0,19 ^a	1,29 ± 0,18 ^a
Zeatin 1mg/l, AIA 0,1mg/l	3,50 ± 0,16 ^b	2,29 ± 0,18 ^b
Zeatin 1mg/l, AIA 0,5mg/l	3,40 ± 0,19 ^b	2,43 ± 0,20 ^b
Zeatin 1mg/l, AIA 0,5mg/l, GA ₃ 1mg/l	7,80 ± 0,12 ^c	3,50 ± 0,22 ^c

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

4. THẢO LUẬN

Trong sự phát triển phát hoa *Dendrobium* sp., mô phân sinh hoa tự đóng vai trò quan trọng. Sự hoạt động của mô phân sinh hoa tự tạo các mô phân sinh hoa ở vùng ngoại vi bên dưới mô phân sinh hoa tự và qua đó quyết định số nụ hoa của phát hoa. Trong tự nhiên, đời sống của mô phân sinh hoa tự kéo dài khoảng 4 tuần, tạo được 6-7 nụ hoa, sau đó thì ngừng hoạt động và héo.

Sự so sánh mô phân sinh hoa tự với mô phân sinh dinh dưỡng, các nụ hoa với các chồi dinh dưỡng ở nách lá đã hấp dẫn một số nhà khoa học hướng về các nghiên cứu phát sinh hình thái và phát sinh chủng loại (Pouteau và cộng sự 1997). Sự nuôi cấy mô phân sinh hoa tự cuối giai đoạn 2 trên môi trường Ma đặc có AIA 0,5mg/l và zeatin 2mg/l tạo cụm chồi dinh dưỡng thay vì tiếp tục tạo mô phân sinh hoa. Như vậy, ở điều kiện không thích hợp cho sự tạo hoa, mô phân sinh hoa tự ở cuối giai đoạn 2 vẫn có thể “trở về” trạng thái mô phân sinh dinh dưỡng.

Sự nuôi cấy mô phân sinh hoa tự ở các giai đoạn phát triển của phát hoa trên môi trường Ma đặc với sự bổ sung AIA 0,5mg/l và zeatin 1mg/l cho thấy: mô phân sinh hoa tự ở giai đoạn 1 và 2 còn duy trì vùng tế bào gốc đa năng hoạt động nên dễ dàng sống sau 3 - 4 tuần (Carles và Fletcher 2003). Ngược lại, mô phân sinh hoa tự ở giai đoạn 3 không thể sống sau 2 tuần nuôi cấy.

Với mục đích kéo dài hơn đời sống của mô phân sinh hoa tự, sự nuôi cấy mô phân sinh hoa tự ở cuối giai đoạn 2 được thực hiện trên môi trường Ma lỏng có bổ sung AIA 0,5mg/l, zeatin 1mg/l và GA₃ 1mg/l. Trên môi trường này, mô phân sinh hoa tự có thể kéo dài đời sống tới trên 8 tuần đồng thời vẫn tiếp tục duy trì hoạt động tạo mới các mô phân sinh hoa.

Như vậy, sự nuôi cấy *in vitro* giúp tạo mới mô phân sinh hoa tự (với khúc cắt ở vị trí 1-4, trên môi trường MS có BA 5mg/l) và kéo dài đời sống mô phân sinh hoa tự để tạo nhiều mô phân sinh hoa và nụ hoa dưới các điều kiện và sự dùng các chất điều hòa tăng trưởng thực vật thích hợp. Tính “mềm dẻo” đáng chú ý trong hoạt động của mô phân sinh hoa tự đã giúp chúng tôi áp dụng có kết quả các hỗn hợp chất điều hòa tăng trưởng thực vật trực tiếp

trên các cây lan *Dendrobium* sp. trưởng thành. Kết quả nghiên cứu này sẽ được công bố trong một bài báo kế tiếp.

5. KẾT LUẬN

Các kết quả nghiên cứu trên *Dendrobium* sp. vừa được trình bày chứng tỏ:

- BA 5mg/l có thể cảm ứng sự tạo mới mô phân sinh hoa tự và có thể giúp mô phân sinh hoa tự tạo cụm chồi dinh dưỡng.

- Mô phân sinh hoa tự ở cuối giai đoạn 2 có thể kéo dài đời sống tới trên 5 tuần khi được nuôi cấy với môi trường Ma có bổ sung zeatin 1mg/l, AIA 0,5mg/l và GA₃ 1mg/l.

STUDY ON INFLORESCENCE DEVELOPMENT OF DENDROBIUM SONIA BY USING IN VITRO CULTURE TECHIQUE

Trinh Cam Tu, Bui Trang Viet

University of Natural Sciences, VNU- HCM

ABSTRACT: Flowering of *Dendrobium* sp. involves the transition of a vegetative meristem, producing leaves and stems, into a floral meristem, producing flower. This inflorescence meristem functions as a site of continuous organogenesis within which there is a small pool of pluripotent stem cells. Longevity and activity of inflorescence meristem corresponding to number of flowers on each inflorescence peduncle were observed by culturing inflorescence meristem explants on Ma medium supplemented with 1mg/l zeatin, 0,5mg/l AIA and 1mg/l GA₃. With 5mg/l BA, inflorescence meristem formed vegetative buds instead of developing of inflorescence. Roles of plant growth regulators on longevity of inflorescence meristem and number of flowers will be discussed.

Key words: *Dendrobium*, flowering, inflorescence meristem, plant growth regulators

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Carles C.C. and Fletcher J.C. , *Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance*, Plant Science, 8:394-401, (2003).
- [2]. Chatelet C. Régénération chez *Musa* sp.: *Recherche des conditions d'établissement de suspensions cellulaires d'espèces diploïdes et triploïdes*. Thèse Doctorat Université Paris XI (Orsay), 84p., (1992).
- [3]. King R.W. and Evans L.T. *Gibberellins and flowering of grasses and cereals: prizing open the lid of the "florigen" black box*. Annu. Rev. Plant Biol., 54:307-328., (2003).
- [4]. Pouteau S., Nicholis D., Tooke F., Coen E., Battey N. The induction and maintenance of flowering in *Impatiens*. Development, 124:3343-3351., (1997).
- [5]. Sobry S., Havelange A., Liners F., Cutsem P.V. *Immunolocalization of homogalacturonans in the apex of the long-day plant Sinapsis alba at floral transition*. Physiologia plantarum, 123:339-347., (2005).

- [6]. Trịnh Cẩm Tú, Trương Thị Đẹp, Bùi Trang Việt, *Tìm hiểu vai trò của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong sự ra hoa ở Lan Dendrobium sp.* Tạp chí phát triển Khoa học Công nghệ, tập 5, số 7&8, 5-12., (2002).