

RESEARCH ON EFFECTS OF PLANT GROWTH REGULATOR TO PROPAGATE DENDRO WHITE WILLOW ORCHIDS

Pham Thi Thu Nhi*, Pham Quynh Anh, Pham Quang Thang, Nguyen Thanh Tai

Research & Development Center for High Technology Agriculture

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 22/3/2023	Dendro White willow orchid (<i>Dendrobium mesangnil</i>) is great attracted due to its beautiful flower color and fragrance. That is why this plant is currently one of the most popular trading in the market. In research on breeding Dendro White willow orchids, the material used for the study is the young shoots with the size of 3 - 4 cm, which are separated from the apical bud and then transferred to the culture medium for rapid multiplication. The goal of this study is to rapidly propagate the Dendro White willow orchid through the PLBs stage, thereby promoting the propagation process to produce seedlings with large quantity and uniform quality to supply to the market. Our result found that, the suitable medium for creating PLBs is MS medium supplemented with 2 mg/L BA combined with 0.5 mg/L NAA for samples with good proliferation of PLBs, hard-formed PLBs. The shoots regenerated and grew well on ½ MS medium with a shoot height of 5.57 cm, open leaves reaching high, creating many roots.
Revised: 16/5/2023	
Published: 16/5/2023	
KEYWORDS	
White willow	
<i>Dendrobium mesangnil</i>	
PLBs	
Apex bud	
½ MS medium	

KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT ĐIỀU HÒA SINH TRƯỞNG THỰC VẬT ĐỂ NHÂN GIỐNG CÂY LAN DENDRO TRẮNG BÀ LIỄU

Phạm Thị Thu Nhi*, Phạm Quỳnh Anh, Phạm Quang Thắng, Nguyễn Thanh Tài

Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ Cao

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 22/3/2023	Cây lan Dendro Trắng bà liễu (<i>Dendrobium mesangnil</i>) từ lâu đã được yêu thích với màu sắc hoa đẹp và có hương thơm. Chính vì thế, hiện nay loài cây này đang là một trong những đối tượng rất được ưa chuộng trên thị trường. Trong nghiên cứu nhân giống cây lan Dendro Trắng bà liễu, vật liệu được sử dụng cho nghiên cứu là chồi non có kích thước từ 3 – 4 cm được tách lấy vùng đỉnh chồi rồi chuyển vào môi trường nuôi cấy để nhân nhanh. Mục tiêu của nghiên cứu này là nhân nhanh giống cây lan Dendro Trắng bà liễu thông qua giai đoạn PLBs, từ đó thúc đẩy quá trình nhân giống nhằm tạo ra cây con với số lượng lớn, cây giống đồng đều để cung cấp cho thị trường. Kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường thích hợp để tạo PLBs là môi trường MS có bổ sung 2 mg/L BA kết hợp với 0,5 mg/L NAA cho mẫu có sự tạo PLBs, PLBs dạng cứng, tăng sinh tốt. Chồi tái sinh và tăng trưởng tốt trên môi trường ½ MS với chiều cao chồi đạt 5,57 cm, lá mở vươn cao, tạo rễ nhiều.
Ngày hoàn thiện: 16/5/2023	
Ngày đăng: 16/5/2023	
TỪ KHÓA	
Dendro Trắng bà liễu	
<i>Dendrobium mesangnil</i>	
PLBs	
Vùng đỉnh chồi	
Môi trường ½ MS	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.7593>

* Corresponding author. Email: phamthithunhi1997@gmail.com

1. Mở đầu

Cây lan Dendro Trắng bà liễu là loài cây được trồng với mục đích thương mại thường sử dụng để cắt cành, với các ưu điểm như chồi hoa dày, vòi hoa dài và buông rũ, ra hoa nhiều đợt trong năm. Cây còn có tên gọi khác là *Dendrobium mesangnil*, đây là một loài lan lai, được lai giữa cây *Dendrobium* Helen Izuta × *Dendrobium* Jaquelyn Thomas. Với ưu điểm dễ trồng dễ chăm sóc và cho hoa thường xuyên, cây lan Dendro Trắng bà liễu luôn được săn đón nhiều nên nhu cầu về cây giống rất lớn. Tại Việt Nam, hầu hết chưa có nghiên cứu nào được công bố về quy trình nhân giống *in vitro* cho cây lan Dendro Trắng bà liễu, phần lớn chỉ dừng lại ở các phòng nuôi cấy mô đơn lẻ thực hiện nhân giống với mục đích thương mại nên gần như không có giá trị khoa học và quy trình không ổn định. Chính vì vậy cần có nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây lan Dendro Trắng bà liễu nhằm mục đích xây dựng quy trình mang tính chính xác cao để phục vụ nhu cầu sản xuất của thị trường hiện nay. Mặc dù đã có rất nhiều nghiên cứu về quy trình nhân giống cho các loài thuộc chi *Dendrobium* [1]-[8], nhưng mỗi loài cây khác nhau sẽ có một ngưỡng chịu tác động của chất điều hòa sinh trưởng thực vật là khác nhau. Bên cạnh đó, việc nhân giống *in vitro* cây lan Dendro Trắng bà liễu khó khăn hơn những loại *Dendrobium* khác do tỷ lệ mẫu bị thoái hóa cao nên phải nhân với hệ số thấp thì mới giảm được tỷ lệ mẫu bị biến dị. Do đó, việc nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây lan Dendro Trắng bà liễu là cần thiết được thực hiện để đáp ứng nhu cầu của thị trường.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguồn nguyên vật liệu

Cây lan Dendro Trắng bà liễu khỏe mạnh, được trồng trong điều kiện nhà lưới của Trung tâm Nghiên Cứu và Phát Triển Nông Nghiệp Công Nghệ Cao, khoảng 2 năm tuổi có các chồi non (2 – 3 tháng tuổi) cao từ 20 – 30 cm để làm vật liệu ban đầu (Hình 1).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp khử trùng mẫu

Mẫu khi cắt khỏi cây mẹ được rửa dưới vòi nước sạch, tách bỏ một ít bao lá bên ngoài, đem ngâm với dung dịch xà phòng loãng trong 15 phút rồi rửa sạch, chuyển vào tủ cấy. Tiếp theo mẫu được ngâm với cồn 70° trong 1 phút. Khử trùng mẫu bằng dung dịch Javel Mỹ Hảo thương mại (5% NaClO) với tỷ lệ Javel : nước là 2:1, thêm 2 – 3 giọt Tween 20 rồi lắc 30 phút. Tách bớt bao lá, sau đó lắc lại với dung dịch HgCl₂ 0,1% có bổ sung 2 – 3 giọt Tween trong 5 phút. Mỗi lần mẫu tiếp xúc với hóa chất sẽ được rửa lại với nước hấp khử trùng từ 3 – 5 lần để loại bỏ hoàn toàn hóa chất ra khỏi bề mặt mẫu. Cuối cùng, cắt mẫu thành đoạn nhỏ chứa mắt ngủ rồi nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/L BA + 30 g/L đường + 8 g/L agar cho đến khi chồi mới đạt kích thước 2 cm, tiến hành tách đỉnh chồi để làm nguyên vật liệu cho thí nghiệm.

2.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên quá trình nhân giống *in vitro* cây lan Dendro Trắng bà liễu

Khảo sát ảnh hưởng của BA kết hợp với NAA lên sự phát sinh hình thái từ chồi đỉnh của lan Dendro Trắng bà liễu: Tiến hành tách các lớp lá của chồi ngủ *in vitro*, chỉ sử dụng phần chồi đỉnh có kích thước khoảng 2 – 5 mm, cấy vào môi trường MS có bổ sung BA (nồng độ 0 – 3 mg/l) kết hợp với 0,5 mg/l NAA, 30 g/l đường sucrose, 8 g/L agar.

Khảo sát ảnh hưởng của Kinetin kết hợp với NAA lên sự phát sinh hình thái từ chồi đỉnh của lan Dendro Trắng bà liễu: Tiến hành tách các lớp lá của chồi ngủ *in vitro*, chỉ sử dụng phần chồi đỉnh có kích thước khoảng 2 – 5 mm, cấy vào môi trường MS có bổ sung Kinetin (nồng độ 0 – 3 mg/l) kết hợp với 0,5 mg/l NAA, 30 g/l đường sucrose, 8 g/L agar.



Hình 1. Chồi non cây lan Dendro Tráng bà liễu ex vitro

Khảo sát ảnh hưởng của TDZ kết hợp với NAA lên sự phát sinh hình thái từ chồi đỉnh của lan Dendro Tráng bà liễu: Tiến hành tách các lớp lá của chồi ngủ *in vitro*, chỉ sử dụng phần chồi đỉnh có kích thước khoảng 2 – 5 mm, cấy vào môi trường MS có bổ sung TDZ (nồng độ 0 – 3 mg/l) kết hợp với 0,5 mg/l NAA, 30 g/l đường sucrose, 8 g/L agar.

Khảo sát ảnh hưởng của môi trường khoáng lên sự sinh trưởng của chồi *in vitro* lan Dendro Tráng bà liễu: Nguồn mẫu sử dụng là chồi *in vitro* có kích thước khoảng 0,5 – 1 cm, cấy vào các môi trường MS [9], KC [10], VW [11], ½ MS (giảm ½ vi lượng, đa lượng) và B5 [12] bổ sung 8 g/L agar, 30 g/L đường, 10 % nước dừa.

Phương pháp lấy số liệu: Các mẫu được theo dõi sau 60 ngày nuôi cấy với các chỉ tiêu theo dõi như: Tỷ lệ mẫu hình thành chồi (%), số lượng chồi trung bình/mẫu, hình thái chồi, chiều cao chồi (cm).

2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thu thập được xử lý thống kê bằng chương trình Statgraphic 3.0. Đọc kết quả dựa vào bảng ANOVA, bảng trung bình và bảng so sánh khác biệt giữa các nghiệm thức (bảng phương pháp Duncan và LSD).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của BA kết hợp với NAA lên sự phát sinh hình thái từ chồi đỉnh của cây lan Dendro Tráng bà liễu

Ở thực vật, sự hình thành các cơ quan bắt đầu trong các mô phân sinh đỉnh, các mô này phân hóa ngay từ những giai đoạn phát triển đầu của phôi và giữ lại trong suốt đời sống của cây. Mô phân sinh có thể tích tương đối ổn định, nên các tế bào sinh ra từ tế bào khởi sinh sau một vài lần phân chia sẽ rời khỏi mô phân sinh. Để tăng hệ số nhân, môi trường nuôi cấy thường được bổ sung thêm các chất điều hòa sinh trưởng thực vật như auxin, cytokinin kết hợp với yếu tố nhiệt độ, ánh sáng thích hợp, kích thích sự phân chia tế bào và điều khiển sự phát sinh hình thái. Khi được bổ sung vào môi trường nuôi cấy chồi thì những hợp chất này sẽ phá vỡ trạng thái hibernant của chồi ngọn và kích thích sự hoạt động của các chồi bên [13].

Theo kết quả ghi nhận được ở bảng 1, khi bổ sung BA ở các nồng độ từ 0 – 3 mg/L BA kết hợp với 0,5 mg/L NAA vào môi trường nuôi cấy thì có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê giữa các nghiệm thức. Về chỉ tiêu tỷ lệ mẫu tạo chồi, khi môi trường không được bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật thì mẫu gần như không có sự tạo chồi hoặc PLBs. Tỷ lệ mẫu tạo chồi thấp nhất chỉ đạt 22,22%. Khi môi trường nuôi cấy được bổ sung 0,5 mg/L NAA kết hợp với BA ở các nồng độ từ 0,5 – 2,5 mg/L thì tỷ lệ mẫu tạo chồi bắt đầu tăng từ 29,63% đến 92,59%. Tuy nhiên, khi nồng độ BA tiếp tục tăng đến 3 mg/L thì tỷ lệ mẫu tạo chồi bắt đầu giảm đi, chỉ đạt 51,85%.

Bảng 1. Sự phát sinh hình thái của chồi đỉnh cây lan *Dendro Tráng bà liễu* in vitro dưới tác động của BA và NAA sau 90 ngày nuôi cấy

NT	Nồng độ BA (mg/L)	Nồng độ NAA (mg/L)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi trung bình/mẫu	Hình thái chồi
ĐC	0	0	22,22 ^c	0,29 ^e ± 0,17	Mẫu xanh, ít có cảm ứng tạo chồi
B1	0,5		29,63 ^c	0,44 ^{de} ± 0,22	Mẫu bị đen, ít có cảm ứng tạo chồi
B2	1,0		55,56 ^{bc}	1,04 ^d ± 0,23	Mẫu bị đen, có cảm ứng tạo chồi nhưng chồi không phát triển
B3	1,5		74,07 ^{ab}	1,74 ^c ± 0,17	Mẫu bị đen, có cảm ứng tạo chồi nhưng chồi chậm phát triển
B4	2,0	0,5	92,59 ^a	8,15 ^a ± 0,17	Mẫu xanh, có sự tạo PLBs, PLBs màu xanh nhạt, tăng sinh tốt
B5	2,5		92,59 ^a	4,96 ^b ± 0,23	Mẫu xanh, có sự tạo PLBs, PLBs màu xanh, tăng sinh chậm
B6	3,0		51,85 ^{bc}	2,26 ^c ± 0,28	Mẫu xanh, có cảm ứng tạo chồi nhưng chồi chậm phát triển
CV (%)			8,6	2,29	

Ghi chú: Các giá trị trung bình trong cùng một cột có các ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa về thống kê ($p < 0,01$).

Về số chồi trung bình/mẫu cũng tương tự như tỷ lệ mẫu tạo chồi, số chồi đạt thấp nhất trên môi trường không được bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật với 0,29 chồi/mẫu, sau khoảng 2 – 3 tuần nuôi cấy thì mẫu chuyển dần sang màu đen rồi chết đi. Khi tăng nồng độ BA từ 0,5 – 2 mg/L thì mẫu bắt đầu có sự phân hóa, tạo nhiều chồi hơn và số chồi đạt cực đại ở nghiệm thức B4 (nồng độ 2 mg/L BA kết hợp với 0,5 mg/L NAA) với 8,15, chồi/mẫu có sự tạo PLBs, PLBs màu xanh nhạt, tăng sinh tốt (Hình 2). Khi nồng độ BA trong môi trường tiếp tục tăng thì số chồi trung bình/mẫu lại giảm đi rõ rệt, cụ thể ở nghiệm thức B6 (3 mg/L BA kết hợp với 0,5 mg/L NAA) thì số chồi/mẫu chỉ đạt 2,26 chồi/mẫu.

**Hình 2.** Sự phát sinh hình thái dưới tác động của BA và NAA sau 90 ngày nuôi cấy

Mục tiêu của thí nghiệm này là tìm được nồng độ BA phù hợp để tạo chồi từ chồi đỉnh. Tuy nhiên, kết quả ghi nhận được trên môi trường có bổ sung 2 mg/L BA kết hợp với 0,5 mg/L NAA mẫu có sự tạo PLBs. So với sự tạo chồi thì sự tạo PLBs sẽ cho ra hệ số nhân chồi cao hơn rất nhiều lần. Do đó, trong thí nghiệm này lựa chọn môi trường có nồng độ BA cho sự tạo PLBs là phù hợp với mục tiêu đặt ra. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trong và ngoài nước về bổ sung BA vào môi trường nuôi cấy để nhân giống một số loài lan *Dendrobium* [1]-[7]... Các nghiên cứu trên đều cho kết quả mẫu tạo được nhiều chồi hoặc PLBs, chồi phát triển tốt, PLBs khả năng tăng sinh nhanh.

Như vậy, môi trường có bổ sung 2 mg/L BA kết hợp với 0,5 mg/L NAA là phù hợp để tạo chồi từ chồi đỉnh ở cây lan *Dendro Tráng bà liễu*.

3.2. Ảnh hưởng của Kinetin kết hợp với NAA lên sự phát sinh hình thái từ chồi đỉnh của cây lan *Dendro Tráng bà liễu*

Chất điều hòa sinh trưởng Kinetin không phải là chất điều hòa sinh trưởng tự nhiên mà nó được tạo thành do sự tái sắp xếp lại cấu trúc của một hợp chất khác. Cũng giống như các loại cytokinin khác, Kinetin cũng có tác động liên quan chủ yếu đến sự phân chia tế bào, sự thay đổi ưu thế ngọn và phân hóa chồi trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, ngăn cản sự lão hóa mô, thúc đẩy sự hình thành chồi non nhưng ức chế sự tạo rễ. Ở một số loài thực vật, Kinetin chỉ có tác dụng kéo dài chồi, còn BA có tác dụng kích thích sự tăng sinh chồi bên nhưng không kéo dài chồi [13].

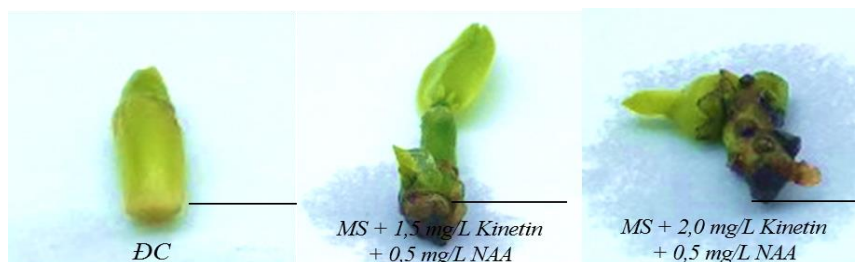
Bảng 2. Sự phát sinh hình thái của chồi đỉnh cây lan Dendro Trắng bà liễu in vitro dưới tác động của Kinetin và NAA sau 90 ngày nuôi cấy

NT	Nồng độ BA (mg/L)	Nồng độ NAA (mg/L)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi trung bình/mẫu	Hình thái chồi
ĐC	0	0	22,22 ^b	0,29 ^b ± 0,17	Mẫu xanh, ít có cảm ứng tạo chồi
K1	0,5		22,22 ^b	0,41 ^b ± 0,28	Mẫu bị đen, ít có cảm ứng tạo chồi
K2	1,0		37,04 ^{ab}	0,56 ^b ± 0,11	Mẫu bị đen ở gốc, ít có cảm ứng tạo chồi
K3	1,5	0,5	40,74 ^{ab}	0,63 ^{ab} ± 0,17	Mẫu bị đen, có cảm ứng tạo chồi nhưng chồi không phát triển
K4	2,0		55,56 ^a	1,07 ^a ± 0,17	Mẫu bị đen, có cảm ứng tạo chồi nhưng chồi không phát triển
K5	2,5		40,74 ^{ab}	0,52 ^b ± 0,12	Mẫu bị đen, ít có cảm ứng tạo chồi
K6	3,0		18,52 ^b	0,19 ^b ± 0,06	Mẫu bị đen, ít có cảm ứng tạo chồi
CV (%)			7,5	15	

Ghi chú: Các giá trị trung bình trong cùng một cột có các ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa về thống kê ($p < 0,01$).

Dựa vào bảng kết quả ghi nhận ở bảng 2, trên môi trường có bổ sung Kinetin kết hợp với NAA cho thấy sự tạo chồi thấp. Ở nồng độ Kinetin từ 0 – 1,5 mg/L, tỷ lệ mẫu tạo chồi gia tăng từ 22,22 – 40,74% và số chồi trung bình/mẫu cũng tăng từ 0,29 – 0,63 chồi. Khi nồng độ Kinetin tăng đến 2 mg/L sẽ cho sự tạo chồi cao nhất với tỷ lệ mẫu tạo chồi đạt 55,56% và số chồi trung bình/mẫu là 1,07 chồi. Tuy nhiên, các chồi rất chậm phát triển hoặc không phát triển. Các nốt sần không có sự tăng sinh và không phát triển thêm sau tuần nuôi cấy thứ 5. Khi tiếp tục tăng nồng độ Kinetin, đặc biệt đến nồng độ 3 mg/L thì tỷ lệ mẫu tạo chồi giảm còn 18,52% và số chồi trung bình/mẫu cũng đồng loạt giảm theo chỉ còn 0,19 chồi/mẫu, chồi nhanh chóng bị chết đi sau 2 – 3 tuần nuôi cấy và ít có sự cảm ứng tạo chồi (Hình 3).

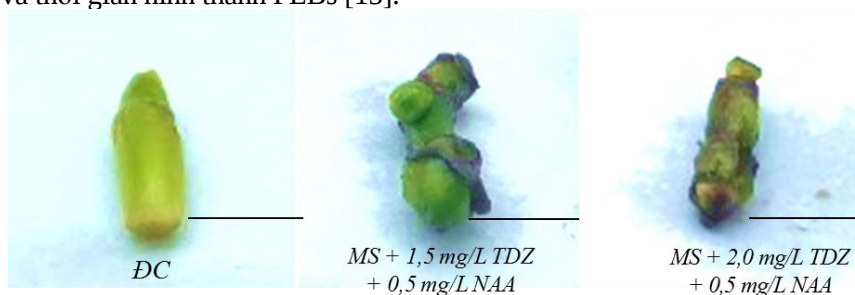
Như vậy, có thể thấy sự kết hợp giữa Kinetin và NAA để nhân chồi ở cây lan Dendro Trắng bà liễu là cho hệ số nhân chồi đạt khá thấp, thấp hơn so với khi nuôi cấy trên môi trường có bổ sung BA. Theo Lê Văn Hoàng (2008) [14], hoạt lực của BA cao hơn so với Kinetin và bền với nhiệt độ. Đúng với nhận định trên, mẫu được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung Kinetin cho sự tạo chồi kém hơn nhiều so với mẫu được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung BA. Đồng thời, mẫu nuôi cấy trên môi trường có bổ sung Kinetin có sự cảm ứng tạo chồi nhưng chồi lại phát triển chậm hoặc mẫu không có khả năng phát triển thành chồi. Nếu sử dụng để nhân nhanh giống với mục đích thương mại thì không đạt được năng suất cao. Do đó, môi trường có bổ sung Kinetin kết hợp với NAA là không hiệu quả trong việc nhân nhanh chồi ở cây lan Dendro Trắng bà liễu.



Hình 3. Sự phát sinh hình thái dưới tác động của Kinetin và NAA sau 90 ngày nuôi cấy

3.3. Ảnh hưởng của TDZ kết hợp với NAA lên sự phát sinh hình thái từ chồi đỉnh của cây lan Dendro Trắng bà liễu

Thidiazuron (TDZ) là một chất điều hòa sinh trưởng thành công trong nuôi cấy tế bào, mô và cơ quan thực vật. Tính chất độc đáo của TDZ là vừa có hoạt tính của auxin lại vừa có hoạt tính của cả cytokinin, có tác dụng kích thích sự phát triển cơ quan và mô sẹo của mẫu cấy. Chất TDZ có ảnh hưởng đáng kể đến các phản ứng nuôi cấy tạo ra PLBs, tốc độ hình thành chồi, số lượng chồi trên mỗi mẫu cấy và thời gian hình thành PLBs [15].



Hình 4. Sự phát sinh hình thái dưới tác động của TDZ và NAA sau 90 ngày nuôi cấy

Bảng 3. Sự phát sinh hình thái của chồi đỉnh cây lan Dendro Trắng bà liễu in vitro dưới tác động của TDZ và NAA sau 90 ngày nuôi cấy

NT	Nồng độ BA (mg/L)	Nồng độ NAA (mg/L)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi trung bình/mẫu	Hình thái chồi
ĐC	0	0	22,22 ^{ab}	0,29 ^{bc} ± 0,17	Mẫu xanh, ít có cảm ứng tạo chồi
T1	0,5		3,70 ^b	0,04 ^c ± 0,06	Mẫu bị đen ở gốc, ít có cảm ứng tạo chồi
T2	1,0		7,41 ^b	0,11 ^{bc} ± 0,11	Mẫu bị đen ở gốc, ít có cảm ứng tạo chồi
T3	1,5	0,5	25,93 ^b	0,48 ^{ab} ± 0,17	Mẫu bị đen, có cảm ứng tạo chồi nhưng chồi chậm phát triển
T4	2,0		44,44 ^a	0,74 ^a ± 0,17	Mẫu bị đen, có cảm ứng tạo chồi nhưng chồi chậm phát triển
T5	2,5		14,82 ^{ab}	0,26 ^{bc} ± 0,17	Mẫu bị đen, ít có cảm ứng tạo chồi
T6	3,0		11,11 ^b	0,15 ^{bc} ± 0,17	Mẫu bị đen, ít có cảm ứng tạo chồi
CV (%)			11,92	17,99	

Ghi chú: Các giá trị trung bình trong cùng một cột có các ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa về thống kê ($p < 0,01$).

Trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của TDZ lên sự nhân chồi ở cây lan Dendro Trắng bà liễu, có thể thấy môi trường có bổ sung TDZ kết hợp với NAA là cho hiệu quả nhân chồi đạt ở mức rất thấp (bảng 3). Mẫu đỉnh chồi sau 90 ngày nuôi cấy gần như sự cảm ứng tạo chồi kém. Trong tuần nuôi cấy đầu tiên, mẫu vẫn xanh, tuy nhiên sang tuần nuôi cấy thứ 2 thì có dấu hiệu bị vàng rồi chuyển sang đen và chết. Theo Kundu và Ganntait (2018), nồng độ TDZ được sử dụng thường rất thấp ($<1 \mu\text{M}$) nhưng lại có hiệu quả hơn nhiều so với nhiều chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác trong giai đoạn tạo PLBs ở cây lan [15]. Mặc dù vậy, nhưng khi khảo sát sự tạo chồi ở cây lan *Dendrobium Dendro Trắng bà liễu* lại không cho kết quả tốt. Nguyên nhân có thể là do nồng độ TDZ bổ sung vào môi trường nuôi cấy quá cao dẫn đến mẫu bị ức chế sự phát triển, các quá trình sinh hóa trong mẫu bị rối loạn, không tổng hợp được các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển của mẫu, dần dần mẫu bị chết đi (Hình 4). Trong nghiên cứu nhân giống in vitro lan Hoàng Thảo Kèn (*Dendrobium lituiflorum* Lindl.) của Phạm Văn Lộc và Lê Thị Hoài Thương (2017) đã sử dụng 2 mg/L TDZ cho tỷ lệ mẫu phát sinh PLBs là cao nhất, PLBs tăng sinh tốt [8]. Hay nghiên cứu vì nhân giống loài lan *Dendrobium trankimianum* T. Yukawa của Bing và cộng sự (2018) cũng sử dụng 1,5 mg/L TDZ để tạo PLBs và cho kết quả tỷ lệ PLBs đạt 92,06% [6].

Tuy nhiên, sử dụng các nồng độ này để bổ sung vào môi trường nuôi cấy tạo PLBs ở cây lan Dendro Trắng bà liễu thì ở nồng độ TDZ càng cao, mẫu càng khó tạo được PLBs. Có thể là do mỗi giống cây khác nhau sẽ có một ngưỡng chịu tác động của chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác nhau, do đó mà trong nghiên cứu này khi bổ sung TDZ từ 0,5 – 3,0 mg/L cho sự tạo chồi kém, dễ bị chết mẫu ở tuần nuôi cấy thứ 2.

Như vậy, môi trường có bổ sung TDZ kết hợp với NAA là không có hiệu quả để nhân chồi ở cây lan Dendro Trắng bà liễu.

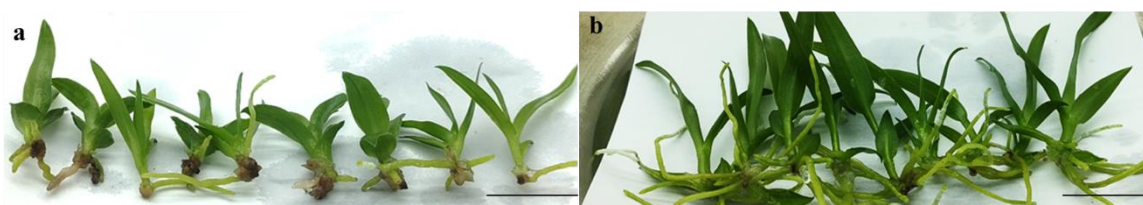
3.4. Ảnh hưởng của môi trường khoáng lên sự tăng trưởng của chồi in vitro lan Dendro Trắng bà liễu

Tăng trưởng ở thực vật chịu tác động của nhiều yếu tố như nhiệt độ, ánh sáng, độ ẩm, dinh dưỡng,... Trong đó, thành phần hóa học của môi trường khoáng trường đóng vai trò quyết định đối với thành công của nuôi cấy tế bào và mô thực vật [14]. Thành phần môi trường nuôi cấy mô thực vật thay đổi tùy theo loài và bộ phận nuôi cấy. Môi trường còn thay đổi tùy theo giai đoạn phân hóa của mẫu cây [13]. Do đó, tùy vào nhu cầu khoáng của từng loại mẫu mà chọn môi trường nuôi cấy cho phù hợp.

Bảng 4. Tác động của môi trường khoáng đến tăng trưởng chồi cây lan Dendro Trắng bà liễu sau 90 ngày nuôi cấy

NT	Môi trường	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái mẫu
M1	MS	1,86 ^d ± 0,16	Chồi nhỏ, màu xanh đậm, lá mỏng ít, tạo rễ ít, rễ ngắn
M2	KC	4,83 ^b ± 0,21	Chồi to, màu xanh nhạt, lá mỏng vươn cao, tạo rễ ít, rễ dài
M3	VW	4,62 ^b ± 0,13	Chồi to, màu xanh nhạt, lá mỏng vươn cao, tạo rễ nhiều, rễ dài
M4	½ MS	5,57 ^a ± 0,24	Chồi to, màu xanh nhạt, lá mỏng vươn cao, tạo rễ nhiều, rễ dài
M5	B5	2,78 ^c ± 0,10	Chồi nhỏ, màu xanh nhạt, lá mỏng ít, tạo rễ ít, rễ dài
CV (%)		4,72	

Ghi chú: Các giá trị trung bình trong cùng một cột có các ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa về thống kê ($p < 0,01$).



Hình 5. Sự tăng trưởng của chồi lan Dendro Trắng bà liễu nuôi cấy trên môi trường MS (a) và ½ MS (b) sau 90 ngày

Kết quả ghi nhận được ở bảng 4 có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê giữa các nghiệm thức. Trên môi trường khoáng MS cho chồi có chiều cao trung bình là thấp nhất với 1,86 cm. Về mặt hình thái, chồi rất chậm phát triển, chồi nhỏ nhất so với các nghiệm thức còn lại, màu xanh đậm, lá mỏng ít, ít tạo rễ (chỉ từ 1-2 rễ), rễ ngắn (chỉ khoảng 0,5-1 cm). Trên môi trường Gamborg B5, mẫu có sự gia tăng về chiều cao chồi, chồi cao hơn so với khi được nuôi cấy trên môi trường MS với chiều cao chồi đạt 2,78. Mẫu chồi được nuôi cấy trên môi trường KC và VW, có sự gia tăng đáng kể về chiều cao lần lượt là 4,83 cm và 4,62 cm. Đặc biệt, trên môi trường ½ MS là mẫu có sự phát triển tốt nhất với chiều cao chồi đạt 5,57 cm, chồi to, phát triển đồng đều nhau, chồi có màu xanh nhạt, lá mỏng đều vươn cao, có nhiều rễ (4-6 rễ) và rễ phát triển dài (chiều dài rễ từ 3-5 cm).

Thành phần khoáng của môi trường có tác động trực tiếp đến sự sinh trưởng và phát triển mô thực vật. Trong đó, vitamin là một trong những yếu tố quan trọng để xúc tác các quá trình biến dưỡng khác nhau [13]. Theo Lê Văn Hoàng (2008), tất cả các tế bào được nuôi cấy đều có khả năng tổng hợp tất cả các loại vitamin cơ bản nhưng thường là với số lượng dưới mức yêu cầu [14]. Để mô có sức sinh trưởng tốt phải bổ sung thêm vào môi trường một hay nhiều loại vitamin, vì vitamin rất cần thiết cho các phản ứng sinh hoá. Bởi vì các môi trường KC, VW hay B5 khá

nghèo dinh dưỡng, không chứa thành phần vitamin nên hầu hết mẫu nuôi cấy trên môi trường này bị chậm phát triển. Còn trên môi trường MS và ½ MS thì có đầy đủ thành phần vitamin nên mẫu phát triển tốt hơn.

Mặt khác, thành phần nitrogen trong môi trường cũng có ảnh hưởng lớn đến quá trình sinh trưởng và phát triển của mẫu. Theo Lê Văn Hoàng (2008), thành phần chính của hầu hết các môi trường là nitơ vô cơ dưới dạng muối nitrat (NO_3^-) hoặc ammonium (NH_4^+), sau đó nhờ enzyme chuyển hóa thành dạng NH_3 để cây dễ hấp thu, sử dụng cho quá trình sinh tổng hợp các amino acid và protein. Amonium và ammoniac là những chất độc đối với thực vật khi được dùng ở nồng độ thấp hoặc ở nồng độ cao vượt ngưỡng hấp thu của thực vật [14]. Thật vậy, bởi vì môi trường MS có hàm lượng (NO_3^-) gấp 2 lần môi trường ½ MS nên mẫu có sự phát triển kém hơn. Tuy nhiên, hàm lượng này chưa đủ lượng để gây độc làm chết mẫu nhưng lại ức chế mẫu phát triển, dẫn đến chiều cao chồi đạt thấp hơn so với khi nuôi cấy trên môi trường ½ MS (Hình 5). Kết quả này tương tự với kết quả của Bing và cộng sự (2018), Nguyễn Thị Hải Yến và Nguyễn Thu Hương (2021), Nguyễn Thị Mỹ Duyên (2021) cũng sử dụng môi trường ½ MS để nuôi cấy tăng trưởng ở một số dòng lan *Dendrobium* khác và cho kết quả mẫu phát triển tốt, không bị bất thường về hình thái [2], [6], [7].

Như vậy, môi trường ½ MS là phù hợp cho sự phát triển của chồi cây lan Dendro Trắng bà liễu với chiều cao chồi đạt 5,57 cm, chồi to, phát triển đồng đều, có màu xanh nhạt, lá mở vươn cao, tạo rễ nhiều và rễ dài.

4. Kết luận

Trong nuôi cấy *in vitro* cây lan Dendro Trắng bà liễu, môi trường phù hợp để tạo chồi từ chồi đỉnh là môi trường MS có bổ sung 2 mg/L BA kết hợp với 0,5 mg/L NAA 30 g/l đường sucrose, 8 g/L agar, kết quả mẫu tạo được 8,15 chồi/mẫu, có sự tạo PLBs, PLBs màu xanh nhạt, tăng sinh tốt. Đồng thời, môi trường ½ MS là phù hợp cho sự phát triển của cây lan *Dendrobium* Dendro Trắng bà liễu trong giai đoạn tăng trưởng (chiều cao chồi đạt 5,57 cm, chồi to, phát triển đồng đều, có màu xanh nhạt, lá mở vươn cao, tạo rễ nhiều và rễ dài sau 90 ngày nuôi cấy).

TÀI KIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] T. L. Le, T. T. Q. Nguyen, T. N. T. Lam, D. T. Nguyen, H. P. Nguyen, and T. B. P. Truong, "A research on *in vitro* propagation of *Dendrobium adastrum*," *Nationwide Biotechnology Conference 2020*, 2020, pp. 897-902.
- [2] T. M. D. Nguyen, "Process of micropropagation the orchid (*Dendrobium anosmum*)," *AGU International Journal of Sciences*, vol. 27, no. 1, pp. 73-82, 2021.
- [3] T. P. Vu, T. H. N. Khuat, and T. T. Nguyen, "The research on *in vitro* propagation of *Dendrobium nestor*," *Journal of forestry Science and Technology*, no. 1, pp. 38-44, 2019.
- [4] T. V. Le, T. L. N. Truong, T. B. T. Nguyen, T. D. Nguyen, T. O. Nguyen, and T. K. C. Nguyen, "*In vitro* propagation of *Dendrobium anosmum* mutation," *Science Magazine of Hue University: Natural Science*, vol. 131, no. 1A, pp. 5-15, 2022.
- [6] H. N. Bing, T. T. Dang, T. V. Tran, V. H. Quach, K. C. Vu, and V. D. Nong, "*In vitro* propagation of the new orchid *Dendrobium trankimianum* t. Yukawa," *Journal of Biotechnology*, vol. 16, no. 4, pp. 649-657, 2018.
- [7] T. H. Y. Nguyen and T. H. Nguyen, "Study on *in vitro* propagation of *Dendrobium asomum* Lindl. distribute in Thai Nguyen province," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 226, no. 10, pp. 39-46, 2021.
- [8] V. L. Pham and T. H. T. Le, "Micropropagation of *Dendrobium lituiflorum* Lindl.," *Journal of Food Science and Technology, Specialization in Biotechnology and Environmental Engineering*, vol. 23, pp. 27-33, 2017.
- [9] T. Murashige and F. Skoog, "A Revised Medium for Rapid Growth and BioAssays with Tobacco Tissue Cultures," *Plant Physiology*, vol. 15, pp. 473-497, 1962.
- [10] L. Knudson, "A new nutrient solution for germination of orchid seed," *American Orchid Society Bulletin*, vol. 15, pp. 214-217, 1946.

- [11] E. F. Vacin and E. W. Went, "Some pH Changes in Nutrient Solutions," *Botanical Gazette*, vol. 110, no. 4, pp. 605-613, 1949.
- [12] O. L. Gamborg, T. Murashige, T. A. Thorpe, and I. K. Vasil, "Plant tissue culture media," *In Vitro*, vol. 12, no. 7, pp. 473-478, 1976.
- [13] D. L. Nguyen, *Cell technology*. Ho Chi Minh City National University Publishing House, 2006.
- [14] V. H. Le, *Textbook of plant tissue culture*. University of Danang Publishing House, 2008.
- [15] S. Kundu and S. Gantait, *Thidiazuron-Induced Protocorm-Like Bodies in Orchid: Progress and Prospects*, Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2018, pp. 273-287.