

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG PHÁT SINH PROTOCORM LIKE BODIES TRỰC TIẾP TỪ PHÁT HOA CÂY LAN *RENANTHERA* SP.

KHA NỮ TÚ UYÊN*, NGUYỄN THỊ HỒNG TÚ*,
VƯƠNG THỊ HỒNG LOAN**, NGUYỄN THỊ ĐIỆP**, PHẠM ĐÌNH DŨNG**

TÓM TẮT

Renanthera là một trong những giống lan cao cấp ở Việt Nam, cây có giá trị cao, phát hoa cứng cáp, phân nhánh nhiều và lâu tàn. Mục đích của nghiên cứu này là tìm được nồng độ Thidiazuron (TDZ) và Naphthalene acetic acid (NAA) đến sự hình thành protocorm like bodies (PLBs) trực tiếp từ phát hoa lan *Renanthera*. Mẫu trong thí nghiệm này là chồi phát hoa có chiều dài 4 – 5cm từ cây trưởng thành. Để giảm sự tiết phenol sau khi khử trùng, mẫu phát hoa được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung PVP 20 mg/l. Sau đó, mẫu được chuyển sang môi trường có bổ sung TDZ 1 mg/l, 51% mẫu phát sinh PLBs sau 05 tuần nuôi cấy với số lượng PLBs thu được trên mỗi mẫu là 50,1 PLBs.

Từ khóa: Protocorm like bodies, PLBs, *Renanthera*, PVP, hóa nâu.

ABSTRACT

Surveying the the ability to create protocorm like bodies directly from *Renanthera* sp.

Renanthera sp. is one of the privileged orchids in Vietnam. They are known for long inflorescences and beautiful flowers. The objective of this research investigation was to analyze the effects of TDZ and NAA on direct PLBs formation from flower stalks of *Renanthera* orchid. Flower stalks, 4-5 cm in length, were used to surface-sterilized. For phenol reduction, flower stalks were cultured on MS medium containing 20 mg/l PVP. PLBs formation rate (51%) and PLBs number (50.1 PLBs) observed on MS medium containing 1 mg/l TDZ after 5 weeks of culture.

Keywords: protocorm like bodies, PLBs, *Renanthera*, PVP, phenolic.

1. Mở đầu

Renanthera là giống lan có những ưu điểm như: phát hoa dài (50-70 cm), kích thước hoa lớn (2 – 5cm), phát hoa phân nhánh nhiều (7-10 nhánh/phát hoa), trung bình có khoảng 15 – 20 hoa/nhánh, hoa lâu tàn (3 - 4 tháng), thích hợp với khí hậu TP Hồ Chí Minh và được thị trường ưa chuộng. Hiện nay, nguồn giống chủ yếu vẫn được nhập từ Thái Lan nên giá thành rất cao. Việc áp dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật trong nhân giống *in vitro* cây là cần thiết. Trong các giai đoạn nhân giống *in vitro* thì giai đoạn tái sinh PLBs (chồi) tạo nguồn mẫu ban đầu góp phần rất quan trọng trong sự thành công của quá trình sản xuất cây giống.

* Kĩ sư, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao TPHCM;
uyentunu85@gmail.com

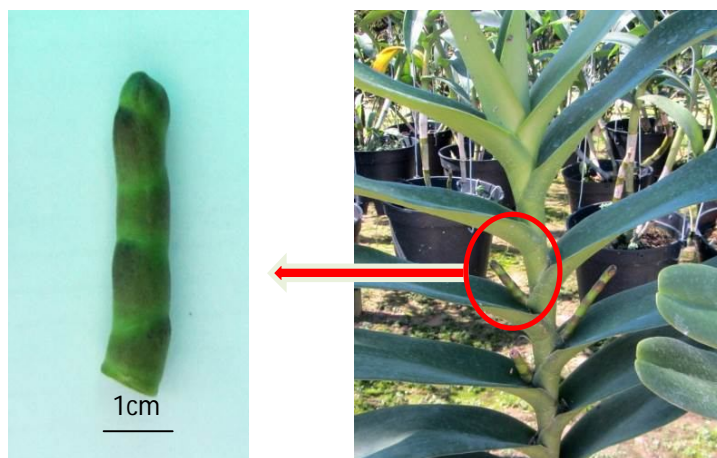
** ThS, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao TPHCM

Có nhiều phương pháp khác nhau để tái tạo PLBs trong nuôi cấy *in vitro* như: sử dụng chồi đỉnh, sử dụng đầu rễ tạo nguồn PLBs vô tính (Park và cs, 2002), tuy nhiên phương pháp này lại cho hiệu suất tái sinh PLBs rất thấp, Sử dụng phát hoa tạo nguồn PLBs vô tính, tái sinh PLBs thông qua mô sẹo từ phát hoa, tạo PLBs từ bộ phận lá (Khoddamzadeh và cs, 2011). Lan *Renanthera* là loài đơn thân, việc sử dụng chồi đỉnh để nuôi cấy sẽ làm tổn thương cây mẹ (Intuwong và Sagawa, 1974), phát hoa là một trong những bộ phận được sử dụng chủ yếu trong việc nhân giống *in vitro*. Mặt khác, *Renanthera* thường tiết nhiều hợp chất phenol từ bề mặt cắt của phát hoa ra môi trường nuôi cấy, gây độc cho mẫu (Fast, 1979). Một trong những khó khăn trong quá trình nhân giống *Renanthera* là vấn đề hóa nâu gây chết mẫu, hiện tượng này do sự oxi hóa các chất có nguồn gốc phenol, chất này có phản ứng độc, và hơn nữa các tế bào chết đi có thể làm giảm hoặc hủy bỏ sự trao đổi giữa mô thực vật và môi trường nuôi cấy (Dương Công Kiên, 2002). Sự hóa nâu mẫu cây dẫn đến sự chết sớm của chồi non *in vitro* và nó liên quan trực tiếp đến hoạt động của enzyme polyphenol oxidase. Sự hóa nâu không liên quan đến mức độ của phenol nội sinh (Huang và cs, 2002). Nhiều phương pháp loại trừ chất tiết này và đặc biệt là các sản phẩm oxy hóa của chúng được thực hiện, chẳng hạn như dùng chất chống oxy hóa, enzyme ức chế phenol, polyvinylpyrrolidone (PVP), than hoạt tính và nhiều loại chất hấp thụ khác. Hầu hết các phương pháp này đều kèm với việc cấy chuyển mẫu sau 2 - 3 tuần sang môi trường mới.

Trong nhân giống *in vitro* lan *Renanthera* thì việc sử dụng phát hoa để tạo PLBs trực tiếp vẫn chưa được nghiên cứu, phương pháp chủ yếu được sử dụng vẫn là tạo chồi từ phát hoa. Nghiên cứu này nhằm tạo nguồn cây giống đồng đều rút ngắn thời gian nhân giống, vì không qua giai đoạn tạo chồi, giảm chi phí sản xuất và hạ giá thành cây giống.

2. Vật liệu, phương pháp

Nguồn mẫu *in vitro*



Hình 1. Phát hoa *Renanthera* sp.

Nguồn mẫu được sử dụng là phát hoa lan *Renanthera* sp. có chiều dài 4-5 cm từ những cây đạt yêu cầu về tính trạng mong muốn như: màu sắc hoa đỏ tươi, siêng hoa, phát hoa dài và có phân nhánh, cây phát triển tốt và không bị bệnh virus. Sử dụng các test thử nhanh như *kit DAS-ELISA* của hãng DSMZ (D-0187, D-0493, D-0100) để đảm bảo các cây mẹ sạch bệnh.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy: MS (Murashige & Skoog, 1962), 30 g/l sacharose, 8 g/l agar, có bổ sung Polyvinylpyrrolidone (PVP), Thidiazuron (TDZ) và Naphthalene acetic acid (NAA) (Merck) tùy thuộc theo từng thí nghiệm, pH môi trường được điều chỉnh từ 5,7- 5,8 (bằng KOH hoặc HCl 1M) và hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút, 1 atm.

Điều kiện nuôi cấy:

Phòng thí nghiệm với cường độ chiếu sáng 2000 lux, nhiệt độ 26°C ± 2°C, thời gian chiếu sáng 10 h/ngày.

Phương pháp

Khảo sát ảnh hưởng của PVP lên sự hóa nâu của mẫu phát hoa lan *Renanthera* sp.

Phát hoa cây lan *Renanthera* được rửa sạch dưới nước để loại bụi bẩn, sau đó sử dụng dung dịch xà phòng loãng, lắc trong vòng 15 phút và rửa sạch với nước. Đưa mẫu vào tủ cấy vô trùng và tiếp tục rửa với nước hấp vô trùng 3 - 4 lần, sử dụng dung dịch cồn 70° khử trùng mẫu 1 - 2 phút, rửa lại với nước hấp vô trùng, sau đó khử trùng với dung dịch Javel Mỹ Hảo® theo tỉ lệ Javel: nước là 2:1 (có bổ sung 1 - 2 giọt Tween 20) trong thời gian 15 - 20 phút và rửa sạch mẫu với nước hấp vô trùng, tiến hành tách bỏ hết các lớp vỏ bao xung quanh đốt phát hoa và cắt từng đoạn 1 cm có chứa đốt và cây lên môi trường có bổ sung PVP 10 - 40 mg/l. Các chỉ tiêu như tỉ lệ mẫu hóa nâu, đường kính vòng hóa nâu xung quanh mẫu, hình thái mẫu được theo dõi và ghi nhận trong 02 tuần nuôi cấy.

Khảo sát ảnh hưởng của TDZ và NAA đến khả năng tạo PLBs trực tiếp từ phát hoa lan *Renanthera*

Phát hoa vô trùng từ thí nghiệm thức tối ưu của thí nghiệm 1 được cấy vào môi trường MS và bổ sung nồng độ TDZ (0,5; 1; 1,5 mg/l) và NAA (0; 0,5; 1 mg/l) ở các thí nghiệm thức khác nhau. Các chỉ tiêu như tỉ lệ mẫu tạo PLBs, số lượng PLBs, hình thái PLBs được ghi nhận sau 06 tuần nuôi cấy.

Xử lí số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 03 lần, số liệu được đánh giá thông qua giá trị trung bình và được xử lí bằng phần mềm xử lí thống kê SPSS phiên bản 11.5. Sự sai khác giữa các giá trị trung bình được đánh giá bằng phương pháp phân tích phương sai ANOVA một chiều (One way ANOVA) và Duncan test với $p = 0,05$.

3. Kết quả thảo luận

Khảo sát ảnh hưởng của PVP lên sự chống hóa nâu mẫu phát hoa lan *Renanthera*.

Để ngăn chặn quá trình hóa nâu mẫu phát hoa lan *Renanthera* chúng tôi tiến hành sử dụng PVP như một chất chống oxy hóa các hợp chất phenol do cây tiết ra khi bị tổn thương và kết quả được ghi nhận ở bảng 1

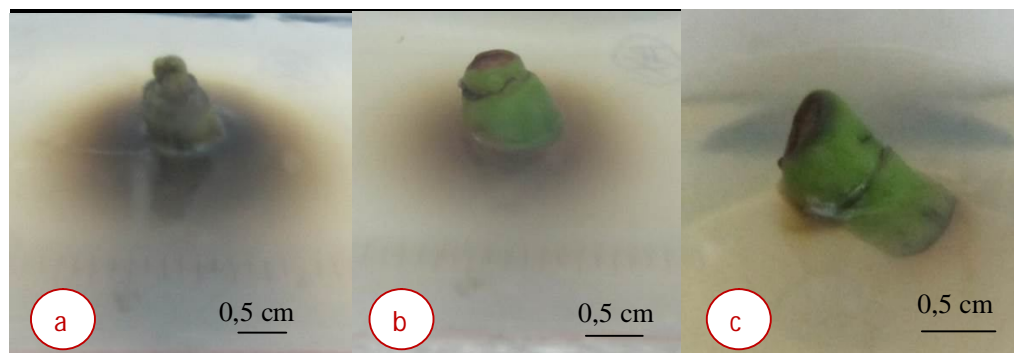
Bảng 1. Ảnh hưởng của PVP lên khả năng chống hóa nâu mẫu phát hoa lan *Renanthera*

PVP (mg/l)	Tỉ lệ mẫu hóa nâu (%)	Đường kính vòng hóa nâu (cm)	Màu sắc môi trường thạch nơi tiếp xúc với mẫu
0	100 ^d	2,1 ^d	Nâu đen
10	13,3 ^c	1,2 ^c	Nâu nhạt
20	9 ^b	0,2 ^b	Nâu nhạt
30	0 ^a	0 ^a	Không hóa nâu
40	0 ^a	0 ^a	Không hóa nâu
CV (%)	4,6	11	

*: Khác biệt ở mức $p < 0,05$ theo xử lý ANOVA một yếu tố

Các kí tự khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$

Theo kết quả ghi nhận ở bảng 1, khi bổ sung PVP vào môi trường mức độ hóa nâu của mẫu giảm rõ rệt. Nghiệm thức không bổ sung PVP tất cả các mẫu đều hóa nâu, vòng hóa nâu to, môi trường thạch nơi tiếp xúc với mẫu có màu nâu đen (hình 2a), mẫu kém phát triển, nếu không chuyển mẫu sang môi trường mới mẫu sẽ hóa nâu và chết dần. Nghiệm thức bổ sung PVP 30 mg/l và 40 mg/l mẫu không hóa nâu, tuy nhiên khi chuyển mẫu sang môi trường cảm ứng tạo PLBs mẫu rất khó tái sinh. Nghiệm thức bổ sung PVP 20 mg/l mẫu hóa nâu ít, vòng hóa nâu nhỏ, màu sắc môi trường thạch nơi mẫu tiếp xúc trực tiếp với môi trường có màu nâu nhạt. Nghiệm thức bổ sung PVP 10mg/l mẫu hóa nâu với đường kính vòng hóa nâu 1,2 cm, môi trường thạch nơi mẫu tiếp xúc trực tiếp với môi trường có màu nâu nhạt. Theo kết quả ghi nhận được thì nồng độ PVP 20, 30 và 40 mg/l gây ức chế sự hóa nâu của mẫu. Vì vậy, nồng độ PVP 20 mg/l thích hợp để ức chế sự hóa nâu của mẫu, nồng độ này không gây ảnh hưởng nhiều đến sự tái sinh PLBs của mẫu.



Hình 2. Ảnh hưởng của PVP đến sự hóa nâu mẫu sau 02 tuần nuôi cấy

a. Không bổ sung PVP b. Bổ sung PVP 10 mg/l. c. Bổ sung PVP 20 mg/l

Khảo sát ảnh hưởng của TDZ và NAA đến khả năng tạo PLBs từ phát hoa cây lan *Renanthera*

Kết quả thu được ở bảng 2 cho thấy tỉ lệ mẫu tái sinh PLBs và số lượng PLBs hình thành trên mỗi mẫu khác nhau khi thay đổi nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng (TDZ, NAA) trong môi trường nuôi cấy.

Ở nghiệm thức không bổ sung NAA mà chỉ bổ sung riêng lẻ TDZ cho tỉ lệ mẫu tái sinh PLBs nhiều hơn đồng thời số lượng PLBs hình thành trên mỗi mẫu cũng cao hơn so với môi trường kết hợp TDZ và NAA. Nghiệm thức bổ sung TDZ với nồng độ càng cao cho tỉ lệ mẫu tái sinh PLBs càng thấp. Nghiệm thức có bổ sung TDZ 0,5 mg/l cho tỉ lệ mẫu tái sinh PLBs cao nhất là 72,4%, tiếp theo là nghiệm thức bổ sung TDZ 1 mg/l với 51% mẫu tái sinh PLBs và thấp nhất là nghiệm thức có bổ sung TDZ 1,5 mg/l. Tuy nhiên, số lượng PLBs tái sinh trên mỗi mẫu lại không tuân theo quy luật trên, ở nghiệm thức có bổ sung TDZ 0,5 mg/l cho tỉ lệ tái sinh PLBs cao nhưng số lượng PLBs hình thành trên mỗi mẫu không cao với 20,7 PLBs, PLBs phát sinh tập trung quanh phần đốt phát hoa, PLBs nhỏ và có xu hướng phát triển thành chồi.

Bảng 2. Ảnh hưởng của NAA và TDZ đến sự phát sinh PLBs trực tiếp từ phát hoa sau 08 tuần nuôi cấy

NT	CDHSTTV (mg/l)		Tỉ lệ mẫu tạo PLBs	Số lượng PLBs/mẫu	Hình thái
	NAA	TDZ			
1	0	0,5	72,4 ^a	20,7 ^c	PLBs nhỏ, có xu hướng phát sinh chồi
2		1	51 ^b	50,1 ^a	PLBs nhiều, hơi mọng nước
3		1,5	14,78 ^e	8 ^e	Mẫu gia tăng kích thước, xốp, phát sinh PLBs kém
4	0,5	0,5	12,6 ^e	7,52 ^{ef}	PLBs kém phát triển

5		1	40 ^c	29,1 ^b	Mẫu hóa nâu một phần
6		1,5	21,9 ^d	12,8 ^d	Mẫu cảm ứng chậm
7	1	0,5	0 ^g	0 ^h	Tạo chồi
8		1	12,6 ^e	5,9 ^f	Mẫu hóa nâu
9		1,5	6,67 ^f	3,4 ^g	Mẫu hóa nâu
CV (%)			6,9	6,6	

*: Khác biệt ở mức $p < 0,05$ theo xử lý ANOVA một yếu tố

Các kí tự khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$

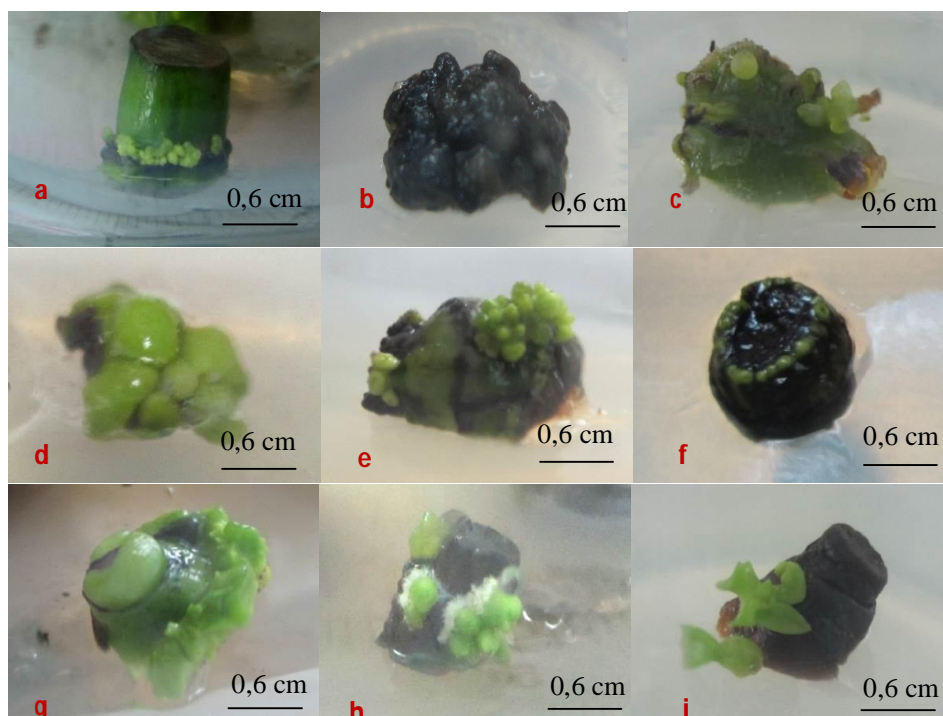
Theo Bùi Trang Việt (2000) thì ở ngọn thân, các đốt ban đầu xếp chồng chất lên nhau; sau đó, các đốt rời xa nhau do sự phân chia và kéo dài của mọi tế bào lông; sau cùng, sự phân chia tế bào giới hạn trong vùng mô phân sinh lông tương đối hẹp, thường ở gốc lông. Trường hợp này có thể là do ở phần gốc lông là nơi có mô phân sinh nên nhanh cảm ứng với môi trường để tạo PLBs. Nghiệm thức bổ sung TDZ 1 mg/l, PLBs phát sinh hầu hết trên bề mặt biểu bì của phát hoa, sự cảm ứng bắt đầu ở những vùng tiếp xúc trực tiếp với môi trường, mẫu bắt đầu gia tăng kích thước và xuất hiện những vùng tế bào nhô lên, theo quan sát từ phẫu thức thì các PLBs phát sinh từ các tế bào nhu mô vỏ của phát hoa (hình 4b). Theo kết quả ghi nhận, khi PLBs bắt đầu khởi phát (hình 5a) (sau 04 tuần nuôi cấy) nếu giữ mẫu trong môi trường này (TDZ 1 mg/l) thì sau một thời gian ngắn (5-7 ngày) mẫu sẽ chết và không phát sinh PLBs (hình 3b), nhưng khi chuyển mẫu sang môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật mẫu sẽ tiếp tục phát sinh PLBs. (hình 5b) Kết quả trên có thể giải thích là do các tế bào biểu bì dễ hấp thu các chất điều hòa sinh trưởng và đã bị khử phân hóa bởi TDZ để tạo nên cấu trúc PLBs, theo Trần Văn Minh (2007) thì tế bào vùng nhu mô phân sinh được xem như là những tế bào có đầy đủ khả năng phát sinh hình thái, có khả năng thích ứng với môi trường nuôi cấy trong biệt hóa chồi, rễ hay phôi. Nghiệm thức có bổ sung TDZ nồng độ 1,5 mg/l, mẫu gia tăng kích thước, bề mặt mẫu sần sùi, xốp và có rất ít PLBs được tái sinh.

Nghiệm thức bổ sung NAA 0,5 mg/l kết hợp với TDZ ở các nồng độ khác nhau cho tỉ lệ tái sinh PLBs thấp, ở nồng độ TDZ 0,5 mg/l mẫu phình to và tạo những cục lồi trên bề mặt mẫu và ít có sự cảm ứng tạo thành PLBs. Nồng độ TDZ 1 mg/l ở vị trí vết cắt mẫu và một số vùng biểu bì mẫu có cảm ứng tạo PLBs nhưng không cao, một phần mẫu bị hóa nâu, Môi trường bổ sung TDZ 1,5 mg/l mẫu hóa nâu nhiều, PLBs được tái sinh dễ hóa nâu và chết theo mẫu.

Nghiệm thức bổ sung NAA 1 mg/l kết hợp với TDZ ở các nồng độ khác nhau cho tỉ lệ tái sinh PLBs rất thấp. Nghiệm thức bổ sung TDZ 0,5 mg/l đa số mẫu tái sinh chồi ở vị trí vết cắt, chồi dính liền vào nhau, một số tạo PLBs nhưng kém phát triển Nghiệm thức có bổ sung TDZ 1 mg/l mẫu có cảm ứng tạo thành PLBs rất thấp. Nghiệm thức bổ

sung TDZ 1,5 mg/l cũng cho kết quả tương tự.

Như vậy, nồng độ TDZ 1 mg/l thích hợp cho sự tái sinh PLBs trực tiếp từ mẫu phát hoa lan *Renanthera*.



Hình 3. Phát hoa *Renanthera* trên các môi trường có bổ sung NAA kết hợp với TDZ với các nồng độ khác nhau sau 08 tuần nuôi cấy

a. TDZ 0,5 mg/l

b. TDZ 1 mg/l

c. TDZ 1,5 mg/l

g. TDZ 0,5 mg/l + NAA 1 mg/l

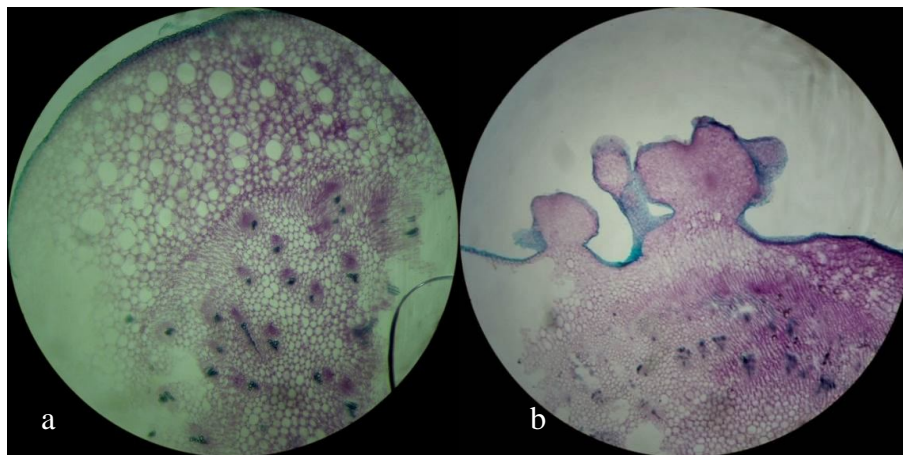
i. TDZ 1,5 mg/l + NAA 1 mg/l

d. TDZ 0,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l

e. TDZ 1 mg/l + NAA 0,5 mg/l

f. TDZ 1,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l

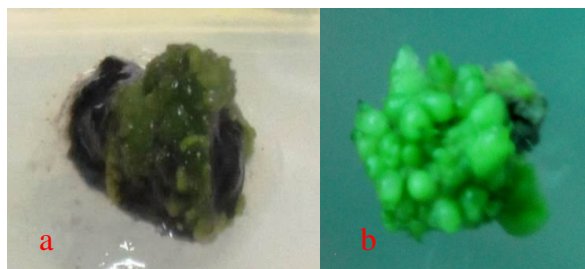
h. TDZ 1 mg/l + NAA 1 mg/l



Hình 4. *Phẫu thức cắt ngang đốt phát hoa nhuộm O2 màu*

a: Chưa cảm ứng tạo PLBs

b: Phát sinh PLBs từ phát hoa



Hình 5. *Tái sinh PLBs trực tiếp từ phát hoa sau 04 tuần nuôi cấy*

a. Mẫu trong môi trường bổ sung TDZ 1mg/l

b. Mẫu trong môi trường MS sau khi chuyển từ môi trường TDZ 1mg/l

4. Kết luận

Qua nghiên cứu ảnh hưởng của TDZ và NAA đến sự phát sinh PLBs lan *Renanthera*, chúng tôi đi đến kết luận:

- Môi trường MS bổ sung PVP 20 mg/l thích hợp để hạn chế sự hóa nâu của mẫu cấy
- Môi trường MS bổ sung nồng độ TDZ 1 mg/l thích hợp cho sự phát sinh PLBs từ phát hoa với 51% mẫu tái sinh PLBs và số lượng PLBs thu được trên mỗi đốt (1cm) là 50,1 PLBs

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dương Công Kiên (2002), *Nuôi cấy mô thực vật*, Nxb Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.
2. Bùi Trang Việt (2000), *Sinh lí thực vật đại cương - phần II: phát triển*, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.
3. Fast, G. (1979), “Klonvermehrung von *Phragmipedium Sedenii* and *Phalaenopsis hybr. aus Blütenknospen*”, *Die Orchidee*, 30: 241-244.
4. Huang, L. C., Lee, Y. L., Huang, B. L., Kuo, C. I., Shaw, J. F. (2002), “High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture”. *In vitro Cell Dev*, 38:358-365.
5. Intuwong, O., and Sagawa, Y. (1974), “Clonal propagation of *Phalaenopsis* by shoot tip culture”, *Am Orchid Soc Bull*, 43: 13-18.
6. Khoddamzadeh, A. A., Sinniah, U. R., Kadir, M. A., Kadzimin, S. B., Mahmood, M., Sreeramanan, S. (2011), “*In vitro* induction and proliferation of protocorm-like bodies (PLBs) from leaf segments of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f) Christenson”, *Plant Growth Regulation* 65: 381-387.
7. Park, S. Y., Yeung, E. C., Chakrabarty, D., and Paek, K. Y. (2002), “An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture”, *Plant Cell Rep*, 21: 46-51.

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 14-9-2015; ngày phản biện đánh giá: 04-11-2015;
ngày chấp nhận đăng: 22-12-2015)