

MICROPROPAGATION OF *RHYNCHOSTYLIS GIGANTEA* L. ORCHID THROUGH PROTOCOL

Dang Thi Thanh Mai¹, Vu Thi Lan^{2*}

¹TNU - University of Medicine and Pharmacy

²TNU - University of Sciences

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 10/5/2021	<i>Rhynchostylis gigantea</i> L. Orchid is an endangered tropical epiphytic orchid that is threatened with extinction due to over-collection and the loss of suitable habitats. A efficient protocol for micropropagation of <i>Rhynchostylis gigantea</i> L. was established successful through protocol to conserve and develop this orchid. Culture mediums supplementing growth regulators BAP, NAA and coconut water (CW), potato homogenate (PH) and banana extracts for protocorm induction, biomass multiplication and shoot regeneration was investigated. Results showed that MS medium supplemented with 2.0 mg.l ⁻¹ BAP is suitable for protocorm induction from callus, the rate is 100%. The most suitable protocorm multiplication medium is VW medium added 1.0 mg.l ⁻¹ BAP, 0.5 mg.l ⁻¹ NAA, 100 ml.l ⁻¹ CW, 40 g.l ⁻¹ PH, 30 g.l ⁻¹ banana extracts. The highest protocorm biomass were gained 4.66 times. VW medium supplemented with 100 ml.l ⁻¹ CW, 40 g.l ⁻¹ PH, 30 g.l ⁻¹ banana extracts (ST2 medium) showed the highest efficiency of PLBs biomass multiplication (17.9 times) and the best shoot regeneration. The most suitable rooting medium was the VW medium supplemented with 1.0 mg.l ⁻¹ NAA, 50 g.l ⁻¹ banana extracts with the highest number of roots/shoot (4.00), the root length was 2.33 cm. This procedure can be applied for large-scale production of <i>Rhynchostylis gigantea</i> L. seedlings.
Revised: 12/6/2021	
Published: 21/6/2021	
KEYWORDS	
Embryogenic cell	
Embryogenic callus	
Protocorm	
<i>Rhynchostylis gigantea</i> L.	
Shoot regeneration	

VI NHÂN GIỐNG LAN ĐẠI CHÂU (*RHYNCHOSTYLIS GIGANTEA* L.) THÔNG QUA GIAI ĐOẠN PROTOCOL

Đặng Thị Thanh Mai¹, Vũ Thị Lan^{2*}

¹Trường Đại học Y Dược - ĐHTH Thái Nguyên

²Trường Đại học Khoa học - ĐHTH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 10/5/2021	Lan Đại châu là loài lan bản địa quý của Việt Nam có nguy cơ tuyệt chủng do mất môi trường sống thích hợp và sự khai thác quá mức của con người. Quy trình vi nhân thông qua phát sinh protocorm từ mô sẹo đã được xây dựng thành công để bảo tồn và phát triển nguồn gen loài lan này. Môi trường nuôi cấy bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng BAP, NAA và dịch chiết khoai tây, chuối tiêu đến sự tạo protocorm, nhân sinh khối và tái sinh chồi đã được khảo sát. Môi trường MS bổ sung BAP 2,0 mg/l phù hợp cho tạo protocorm từ mô sẹo, tỉ lệ đạt 100%. Môi trường nhân protocorm phù hợp nhất là môi trường VW bổ sung BAP 1,0 mg/l, NAA 0,5 mg/l, nước dừa 100 ml/l, khoai tây 40 g/l, chuối tiêu 30 g/l cho sinh khối protocorm tăng 4,66 lần so với ban đầu. Môi trường VW bổ sung nước dừa 100 ml/l, khoai tây 40 g/l, chuối tiêu 30 g/l cho hiệu quả nhân sinh khối PLBs tăng 17,9 lần so với ban đầu và tái sinh chồi tốt nhất. Môi trường VW bổ sung NAA 1,0 mg/l, chuối tiêu 50 g/l phù hợp nhất cho ra rễ của chồi với số rễ đạt 4,0 rễ/chồi, chiều dài rễ đạt 2,33 cm. Quy trình vi nhân giống này có thể ứng dụng để sản xuất cây giống Đại châu với quy mô lớn.
Ngày hoàn thiện: 12/6/2021	
Ngày đăng: 21/6/2021	
TỪ KHÓA	
Mô sẹo phôi hóa	
Protocorm	
<i>Rhynchostylis gigantea</i> L.	
Tái sinh chồi	
Tế bào phôi	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4467>

* Corresponding author. Email: lanvt@tnu.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Lan Đai châu (*Rhynchostylis gigantea*) thuộc chi lan Ngọc điểm (*Rhynchostylis* Blume), phân bố ở các khu rừng của Việt Nam, Lào, Myanmar, Thái Lan, Malaysia, China, Bangladesh và Philippine. Đai châu là một loài lan bản địa quý của Việt Nam, một trong những loài hoa được người tiêu dùng ưa chuộng và được trồng phổ biến, ra hoa vào dịp tết âm lịch. Cây hoa lan Đai châu có tiềm năng phát triển sản xuất mở rộng ở Việt Nam [1]. Hiện nay, nguồn lan Đai châu rừng ở nước ta đã bị khai thác quá mức và đứng trước nguy cơ tuyệt chủng. Do đó, việc chọn tạo được các loài lan Đai châu bản địa, có ưu điểm về sinh trưởng, màu sắc hoa đẹp để nghiên cứu bảo tồn và phát triển là rất có ý nghĩa. Hạt lan Đai châu không có nội nhũ, vì vậy trong điều kiện tự nhiên, hạt rất khó nảy mầm và phát triển thành cây con. Phương pháp nhân giống truyền thống là tách chồi, tuy nhiên hệ số nhân rất thấp vì cây sinh trưởng, phát triển chậm. Do đó, để bảo tồn và phát triển loài lan quý hiếm này cần thiết phải tiến hành nhân giống bằng công nghệ nuôi cấy mô và tế bào với quy mô lớn.

Đã có nhiều nghiên cứu để tìm ra phương thức nhân giống phù hợp cho loài bản địa khác nhau như phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào [2], tái sinh cây trực tiếp từ nuôi cấy các mảnh cắt lá [3], tuy nhiên, những phương pháp này không thể sử dụng được cho vi nhân giống thương mại một cách hiệu quả. Trước đây, có rất ít báo cáo về việc nuôi cấy mô sẹo ở hoa lan, nguyên nhân có thể là do sự phát triển chậm và xu hướng hoại tử của mô sẹo ở lan. Tái sinh cây từ mô sẹo của phong lan thường đạt được thông qua sự hình thành PLBs (Protocorm - like bodies), điều này được cho là liên quan đến sự hình thành phôi soma [4]. Sau đó, những thành công trong nuôi cấy mô sẹo tạo phôi (Embryogenic callus - EC) đã thu được từ các bộ phận đang phát triển như đầu chồi và ngọn chồi của cuống hoa ở lan Hồ điệp [4]-[6], *Oncidium* và *Cymbidium* [7]. Vì vậy, hướng nghiên cứu mô sẹo tạo phôi có triển vọng được sử dụng làm vật liệu để nhân giống thương mại ở chi lan Ngọc điểm (*Rhynchostylis*). Việc nhân giống *in vitro* thông qua protocorm (PLBs) của *Rhynchostylis* đã được nhiều tác giả công bố. Giống lan Đai châu đột biến hoa trắng được nhân nhanh thông qua PLBs từ hạt chưa trưởng thành 4 tháng tuổi [8]. Lan Chang Daeng (*Rhynchostylis gigantea* var. *Sagarik*) được vi nhân giống bằng mô sẹo phôi hóa [9]. Tái sinh cây thông qua hình thành phôi soma từ mảnh cắt lá và rễ của lan Đuôi chồn *Rhynchostylis retusa* (L.) Blume [10]. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng lên sự phát triển, sự tái sinh và nhân sinh khối protocorm có nguồn gốc từ hạt non của lan Đuôi chồn (*R. retusa*) đã được báo cáo [11]. Giống lan Đai châu đỏ (*Rhynchostylis gigantea* L.) đã được nuôi cấy *in vitro* thành công từ hạt lan 9 tháng tuổi qua các giai đoạn hạt nảy mầm tạo protocorm, tạo phôi soma và tái sinh chồi [12]. Trần Văn Minh (2019) đã nghiên cứu vi nhân giống lan Đai châu bằng phương pháp nuôi cấy phôi soma [13].

Bài báo này chúng tôi trình bày các kết quả về nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng BAP, NAA và nước dừa, dịch chiết khoai tây và chuối đến sự tạo thành protocorm, nhân sinh khối protocorm và tái sinh chồi ở loài *Rhynchostylis gigantea* L. trồng thuần ở điều kiện Thái Nguyên, Việt Nam.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Loài lan Đai châu (*Rhynchostylis gigantea* L.) thuộc họ phong lan (*Orchidaceae*) đã được trồng thuần 5 năm tại vườn lan ở Thái Nguyên. Lựa chọn những cây không bị sâu bệnh, kiểu dáng đẹp, hoa đẹp và thơm để lấy quả và hạt. Hạt sau khi thụ phấn 12 tháng được sử dụng để làm vật liệu nuôi cấy khởi đầu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp khử trùng quả

Quả lan Đai châu sau khi thụ phấn được khoảng 12 tháng tuổi được thu về và tiến hành khử trùng để thu mẫu hạt. Quả được rửa dưới vòi nước chảy, tiếp theo rửa sạch mẫu bằng xà phòng

loãng, sau đó tráng mẫu bằng nước cất, mang vào tủ cấy vô trùng để khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong 12- 15 phút. Quả sau khi khử trùng dùng dao cấy bóc vỏ quả, tách lấy hạt và nuôi cấy trên môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) [14] để hạt nảy mầm.

Nghiên cứu sự tạo protocorm từ mô sẹo

Mô sẹo hình thành trên môi trường nuôi cấy chồi non được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu sự phân hóa của mô sẹo và khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo. Môi trường tạo protocorm từ mô sẹo là môi trường MS bổ sung nước dừa 100 ml/l và chất kích thích sinh trưởng BAP có nồng độ thay đổi từ 1,0 mg/l - 4,0 mg/l (Môi trường từ PH1-PH5). Mỗi môi trường cấy 7 - 10 bình, mỗi bình cấy lượng mô sẹo tương đương nhau. Đánh giá khả năng tạo protocorm sau 4 tuần, 8 tuần.

Nhân sinh khối protocorm

Protocorm sơ cấp phát sinh từ mô sẹo ở thí nghiệm trên được sử dụng để nhân sinh khối protocorm và nghiên cứu sự biệt hóa tạo PLBs (Protocorm-like bodies) trên các môi trường nhân sinh khối. Môi trường nhân sinh khối protocorm là môi trường nền MS hoặc VW (Vaccin và Went, 1949) [15] được bổ sung BAP 1 - 2 mg/l kết hợp NAA 0,5 mg/l hoặc bổ sung kết nước dừa, khoai tây và chuối. Mỗi công thức môi trường cấy 10 bình, mỗi bình cấy lượng protocorm tương đương nhau. Theo dõi và đánh giá sự sinh trưởng và phát triển của protocorm (kích thước khối protocorm, tốc độ tăng trưởng, sự biệt hóa tế bào) của tất cả các môi trường đến 50 ngày. Sau đó, đối với môi trường P3 và P6, mỗi bình ban đầu được cân trọng lượng và theo dõi sinh trưởng và phát triển, cân trọng lượng sau 50 ngày, 70 ngày nuôi cấy. Kí hiệu và thành phần môi trường cụ thể ở bảng 1.

Bảng 1. Thành phần một số môi trường nghiên cứu nhân sinh khối protocorm và tái sinh chồi từ protocorm

Môi trường	Thành phần môi trường
ĐC1:	MS + Than hoạt tính 0,5 g/l + Sucrose 20 g/l + Agar 8 g/l
P1:	ĐC1 + BAP 1 mg/l + NAA 0,5 mg/l
P2:	ĐC1 + BAP 2 mg/l + NAA 0,5 mg/l
P3:	P1 + Nước dừa 100 ml/l+ Khoai tây 40 g/l + Chuối tiêu 30 g/l
P4:	P2 + Nước dừa 100 ml/l+ Khoai tây 40 g/l + Chuối tiêu 30 g/l
ĐC2	VW + Than hoạt tính 0,5g/l + Sucrose 20 g/l + Agar 8 g/l
P5:	ĐC2 + BAP 1 mg/l + NAA 0,5 mg/l
P5*:	ĐC2 + Nước dừa 100 ml/l+ Khoai tây 40 g/l + Chuối tiêu 30 g/l
P6:	ĐC2 + BAP 1 mg/l + NAA 0,5 mg/l + Nước dừa 100 ml/l + Khoai tây 40 g/l + Chuối tiêu 30 g/l
ST1	ĐC1 + Nước dừa 100 ml/l+ Khoai tây 40 g/l + Chuối tiêu 30 g/l
ST2	ĐC2 + Nước dừa 100 ml/l+ Khoai tây 40 g/l + Chuối tiêu 30 g/l

Nghiên cứu sự tái sinh chồi từ protocorm

Các protocorm sau khi nhân sinh khối được cấy chuyển lên môi trường tái sinh chồi. Môi trường tái sinh chồi là môi trường MS hoặc VW bổ sung các thành phần dịch chiết thực vật là nước dừa 100 ml/l, khoai tây 40 g/l và chuối 30 g/l (Kí hiệu môi trường là ST1 và ST2, thành phần môi trường ở bảng 1). Mỗi công thức môi trường cấy 10 bình, mỗi bình ban đầu được cân trọng lượng. Theo dõi và đánh giá sự biệt hóa chồi từ protocorm sau 60 ngày, 90 ngày.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ NAA đến khả năng ra rễ

Chồi tái sinh có chiều cao khoảng từ 1,5 - 2,0 cm được tách ra và cấy chuyển lên môi trường kích thích chồi ra rễ tạo cây hoàn chỉnh là môi trường VW có bổ sung nước dừa 100 ml/l + chuối 50 g/l + sucrose 20 g/l + agar 7,5 g/l + than hoạt tính 0,5 g/l và bổ sung NAA với nồng độ 0, 0,5, 1,0, 2,0 mg/l (Môi trường ĐC, R1, R2, R3). Mỗi công thức môi trường cấy 10 bình, mỗi bình 10 - 15 chồi. Theo dõi và đánh giá sự tạo rễ và sinh trưởng của chồi sau 90 ngày.

Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được bố trí 3 lần lặp lại. Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS (version 16.0) và phương pháp Duncan's test (Duncan, 1995) với mức sai khác có ý nghĩa $P = 0,05$. Đối với các bảng số liệu, trong phạm vi cùng một cột, các giá trị mang các chữ cái khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $P = 0,05$.

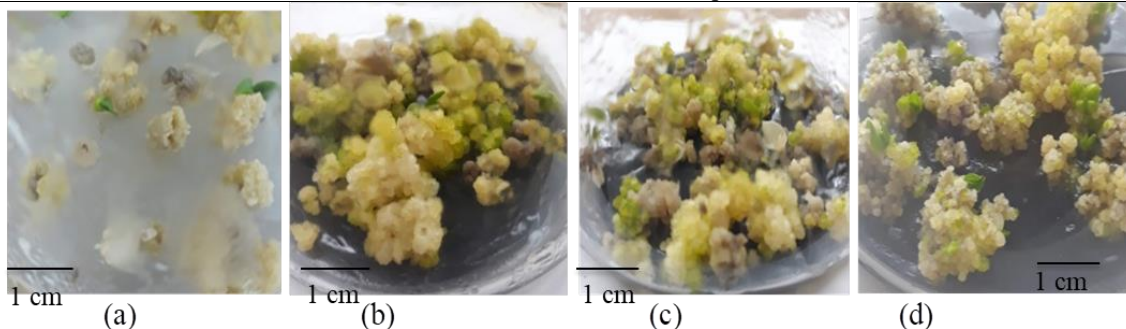
3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Tạo protocorm từ mô sẹo

Sự biệt hóa protocorm từ mô sẹo thu được trên các môi trường nuôi cấy khác nhau sau 8 tuần nuôi cấy đã có sự khác biệt đáng kể (bảng 2). Khi nuôi mô sẹo trên môi trường PH1 bổ sung BAP 1,0 mg/l và NAA 0,5 mg/l (môi trường phát sinh mô sẹo ban đầu, kết quả không trình bày ở đây) cho thấy mô sẹo tiếp tục sinh trưởng và phát triển tạo sinh khối mô sẹo lớn (Hình 1a), sau đó các tế bào mô sẹo phân hóa tạo dạng mô sẹo phôi hóa nhưng rất chậm và chưa tái sinh chồi. Vì vậy có thể sử dụng môi trường này ở giai đoạn đầu để nhân nhanh mô sẹo. Đối với các môi trường từ PH2 đến PH5, bổ sung BAP với các nồng độ 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 mg/l và kết hợp bổ sung nước dừa 100 ml/l đã có sự khác biệt về sự biệt hóa mô sẹo và khả năng tái sinh của mô sẹo phôi hóa. Mô sẹo tiếp tục sinh trưởng và phát triển rất tốt, biệt hóa tạo thành dạng mô sẹo phôi hóa hay protocorm (Hình 1b-c). Môi trường PH3 và PH4, bổ sung BAP 2,0 và 3,0 mg/l, protocorm sinh trưởng rất tốt. Khi tiếp tục nuôi cấy, trên bề mặt khối protocorm xuất hiện các tế bào chuyển màu xanh, về sau tạo mầm chồi và chồi (Hình 1d). Trong đó, môi trường PH3 (BAP 2 mg/l) có tỉ lệ tạo chồi từ protocorm cao, đạt 85%, có khoảng 20 chồi mỗi bình, trong khi các môi trường khác chỉ có từ 3 đến 7 chồi/bình. Điều này có thể dự đoán ở giai đoạn tạo chồi từ protocorm có thể giảm nồng độ BAP bổ sung vào môi trường. Một số tác giả đã báo cáo về ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy cũng như các chất điều hòa sinh trưởng đến sự phát sinh protocorm trong nuôi cấy lan Đại châu. Li và Xu (2009) cho rằng, mô sẹo hình thành sẽ tạo thành protocorm khi chuyển sang môi trường MS không có hormone sau 30 ngày nuôi cấy và sau đó phát triển thành chồi có 2-4 lá [8]. Mô sẹo phát triển từ hạt non trên môi trường khoáng bổ sung thêm BAP 1,0 mg/l và NAA 1,0 mg/l cho hiệu quả mô sẹo tạo protocorm cao nhất (13,93 protocorm/mô sẹo) [16].

Bảng 2. Ảnh hưởng của BAP và nước dừa đến khả năng tạo protocorm từ mô sẹo sau 8 tuần nuôi cấy

Môi trường	BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Nước dừa (ml/l)	Tỉ lệ tạo protocorm (%)	Đặc điểm protocorm	Tỉ lệ tạo chồi từ protocorm (%)
PH1	1,0	0,5	0	50,0 a	khối protocorm nhỏ	0,0 a
PH2	1,0	0	100	80,0 b	khối protocorm to	35,0 b
PH3	2,0	0	100	100 c	khối protocorm rất to	85,0 c
PH4	3,0	0	100	100 c	khối protocorm rất to	35,0 b
PH5	4,0	0	100	100 c	khối protocorm to	30,0 b



Hình 1. Sự tạo protocorm từ mô sẹo sau 8 tuần: (a) Mô sẹo ban đầu trên môi trường PH1, (b,c) Protocorm trên môi trường bổ sung BAP 2 - 3 mg/l, (d) Mầm chồi hình thành trên môi trường bổ sung BAP 2 mg/l; Đặc điểm khối protocorm: nhỏ: kích thước < 1cm, to: đường kính 1-1,5 cm, rất to: đường kính > 1,5 cm

3.2. Nhân sinh khối protocorm và sự biệt hóa protocorm

Kết quả nuôi cấy ở bảng 3 cho thấy, sau 15 ngày, trên các môi trường đối chứng là ĐC1 (môi trường MS), ĐC2 (môi trường VW) protocorm sinh trưởng chậm, tạo sinh khối nhỏ và sự biệt hóa tế bào chậm hơn so với các môi trường P1 - P6. Trên bảy môi trường nghiên cứu (P1 - P6) bổ sung BAP 1,0 - 2,0 mg/l kết hợp NAA 0,5 mg/l (P1, P2, P5) hoặc bổ sung BAP và NAA với dịch chiết thực vật là khoai tây 40 g/l, chuối tiêu 30 g/l (P3, P4, P6) hoặc chỉ bổ sung dịch chiết từ

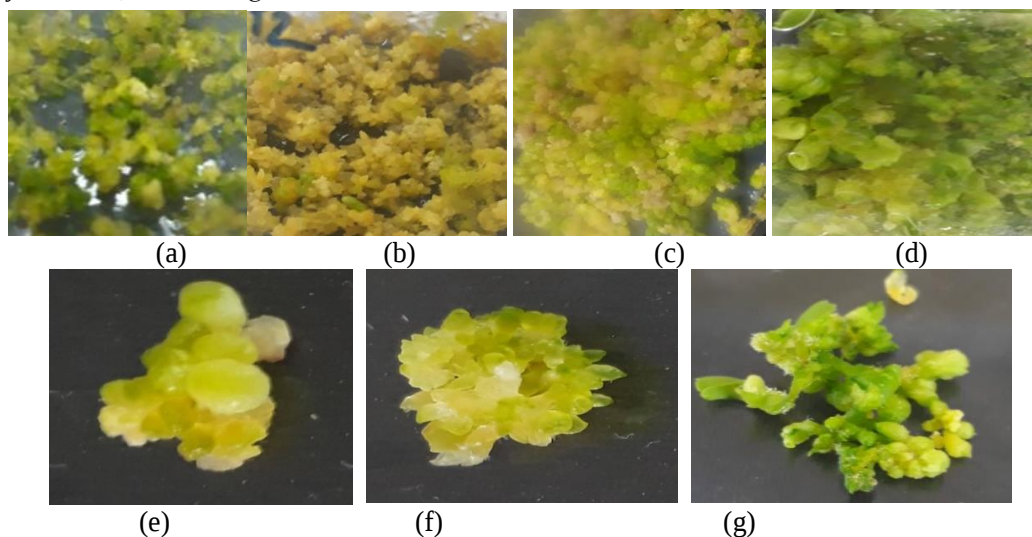
thực vật (P5*) protocorm đều tiếp tục sinh trưởng và phát triển, tuy nhiên có sự khác biệt khá rõ rệt giữa các nhóm môi trường. Nhóm môi trường P5 và P6 có protocorm sinh trưởng và phát triển mạnh nhất, sau đó đến môi trường P3 và P4, cuối cùng là môi trường P1 và P2, P3.

Các môi trường P1, P2 khối protocorm kích thước khá to, các tế bào protocorm nhỏ li ti, liên kết chặt với nhau, có màu vàng tươi (Hình 2b). Đến 30 ngày và 50 ngày protocorm ở môi trường P1 sinh trưởng vượt trội hơn P2 tạo khối protocorm có màu xanh, tế bào nhỏ và có thể tương đương với tốc độ sinh trưởng của protocorm trên môi trường P5 và P6 ở 30 ngày. Như vậy, môi trường chỉ bổ sung BAP với nồng độ 1,0 - 2,0 mg/l kết hợp NAA 0,5 mg/l có hiệu quả nhân sinh khối thấp. Protocorm trên hai môi trường P3 và P4 đã có sự sinh trưởng tốt hơn hẳn so với môi trường P1 và P2. Sau 15 ngày, các môi trường P3 và P4 có khối protocorm to hơn, các tế bào biệt hóa nhanh hơn nên có kích thước to và rời rạc, có màu xanh (Hình 2c). Đặc điểm này vẫn được duy trì khi theo dõi đến 50 ngày. Rõ ràng bổ sung tổ hợp các chất hữu cơ phức tạp từ khoai tây và chuối, nước dừa đã làm cho các tế bào protocorm nhân lên và biệt hóa tạo chồi tốt hơn.

Bảng 3. Đặc điểm sinh trưởng của protocorm trên các môi trường nhân sinh khối sau 50 ngày

Môi trường	Đặc điểm protocorm sau 30 ngày	Kích thước tế bào	Màu sắc Protocorm	Tốc độ sinh trưởng PLB
ĐC1(MS)	Khối protocorm khá to, chứa các tế bào nhỏ li ti, vàng	Nhỏ	Vàng nhạt	Khá
P1	Khối protocorm khá to, chứa các tế bào nhỏ li ti, vàng	Nhỏ	Vàng	Khá
P2	Khối protocorm khá to, chứa các tế bào nhỏ li ti, vàng	Nhỏ	Vàng	Khá
P3	Khối protocorm to, chứa các tế bào nhỏ, vàng	Trung bình	Vàng/xanh	Tốt
P4	Khối protocorm to, chứa các tế bào nhỏ, khá rời rạc, vàng hoặc xanh	Trung bình	Vàng/xanh	Tốt
ĐC2(VW)	Khối protocorm khá to, chứa các tế bào nhỏ li ti, vàng	Nhỏ	Vàng	Khá
P5*	Khối protocorm to chứa các tế bào nhỏ, rời rạc, vàng	Nhỏ	Vàng	Tốt
P5	Khối protocorm to chứa các tế bào to, rời rạc, xanh	To	Xanh	Rất tốt
P6	Khối protocorm to chứa các tế bào to, rời rạc, xanh	To	Xanh	Rất tốt

Ghi chú: Đánh giá tốc độ sinh trưởng của protocorm: Khá: khối protocorm khá to, chưa che kín bình môi trường nuôi; Tốt: Khối protocorm to, che kín bề mặt môi trường nuôi; Rất tốt: Khối protocorm to, che kín và dày lên bề mặt môi trường nuôi.



Hình 2. Nuôi cấy nhân sinh khối protocorm (a-d) và hình thái tế bào protocorm (e-g) sau 50 ngày: (a) Protocorm ban đầu, (b) Protocorm trên môi trường P1, (c, d) Protocorm trên các môi trường P3 và P6, (e, f) Tế bào phân hóa của protocorm; (g) Tế bào của protocorm lục hóa

Đối với nhóm môi trường P5 và P5*: vẫn giữ nguyên thành phần các chất bổ sung vào môi trường như P1 nhưng môi trường nền MS được thay bằng môi trường VW. Sau 50 ngày nuôi cấy cho thấy, môi trường P5 (VW bổ sung BAP 1,0 mg/l và NAA 0,5 mg/l) protocorm sinh trưởng

rất tốt và tốt hơn so với môi trường P1 (nền môi trường là MS). Còn trên môi trường P5* (chỉ bổ sung các chất hữu cơ là nước dừa, khoai tây và chuối) cũng cho hiệu quả nhân protocorm trung bình, khối protocorm gồm các tế bào nhỏ và tốc độ sinh trưởng kém hơn P5. Đặc biệt môi trường P6 (VW bổ sung BAP 1,0 mg/l và NAA 0,5 mg/l và bổ sung các chất hữu cơ là nước dừa 100 ml/l, khoai tây 40 g/l và chuối 30 g/l) cho hiệu quả nhân protocorm tốt nhất. Sau 30 ngày nuôi cấy, các khối protocorm to, phủ kín bình nuôi cấy, các tế bào to, rời rạc, màu xanh (Hình 2d). Điều này chứng tỏ nền môi trường VW phù hợp cho giai đoạn nhân sinh khối và biệt hóa protocorm thứ cấp hơn môi trường MS và môi trường nuôi cấy cần có sự kết hợp của các chất điều hòa sinh trưởng và các chất hữu cơ từ thực vật.

Sau khi dựa vào kết quả về quan sát hình thái, đặc điểm sinh trưởng và phát triển của sinh khối protocorm trong thí nghiệm trên, chúng đã chọn môi trường P3 và P6 để nghiên cứu sâu hơn ảnh hưởng của môi trường đến sự sinh trưởng protocorm và sự biệt hóa chồi từ protocorm của hai môi trường này. Chúng tôi thu sinh khối protocorm vào khoảng 50 ngày nuôi cấy ở lần cấy chuyển thứ nhất và sau 70 ngày nuôi cấy ở lần cấy chuyển thứ 2 (Bảng 4).

Bảng 4. Sinh khối protocorm trên môi trường P3 và P5 sau hai lần cấy chuyển

Môi trường	Trọng lượng tươi của protocorm lần cấy chuyển 1 (g/bình)			Trọng lượng tươi protocorm lần cấy chuyển 2 (g/bình)			Hệ số nhân trung bình của mỗi lần cấy chuyển (lần)
	Ban đầu	50 ngày	Tăng	Ban đầu	70 ngày	Tăng	
P3	3,02 a	10,41 b	7,39 ± 2,82	4,60 a	17,80 b	13,2 ± 5,90	3,66 ± 0,30
P6	2,76 a	14,63 c	11,87 ± 6,02	5,74 a	23,43 c	17,69 ± 3,47	4,69 ± 0,86

Ở giai đoạn đầu, đa số protocorm chứa các tế bào nhỏ li ti, khi cấy chuyển tiếp trên các môi trường tương ứng thì protocorm có xu hướng phân hóa tạo các tế bào to, rời rạc. Môi trường P6 có khối protocorm to, chứa các tế bào có kích thước to hơn môi trường P3, sắp xếp rời rạc, màu xanh đậm. Ở lần nuôi cấy đầu tiên, sinh khối protocorm của P3 và P6 thu được khá cao và có sự khác biệt rõ rệt so với đối chứng, đạt lần lượt là 10,41 g và 14,63 g. Trong đó sinh khối trên P6 đạt cao hơn so với đối chứng là 11,87 g, còn sinh khối trên P3 cao hơn đối chứng là 7,39. Ở lần cấy chuyển thứ 2, sinh khối protocorm (g/bình) đạt được rất cao sau 70 ngày nuôi cấy trên cả môi trường P3 và P6, lần lượt là 17,8 g và 23,43 g, tăng 13,2 g và 17,69 g so với ban đầu. Sinh khối protocorm đạt được trên môi trường P6 cao hơn trên môi trường P3, hệ số nhân trung bình đạt được của mỗi lần cấy chuyển trên môi trường P6 và P3 lần lượt là 4,69 và 3,66 lần. Kết quả này tương tự với báo cáo của Bakul và Shahinul (2015), khi nghiên cứu nhân nhanh protocorm thứ cấp của loài lan Đuôi chồn (*R. Retusa*) cũng cho thấy hàm lượng BAP kết hợp NAA ảnh hưởng mạnh đến sự nhân protocorm. Số lượng PLBs thứ cấp cao nhất là 16,0 thu được từ mỗi protocorm sơ cấp trong môi trường MS được bổ sung BAP 1,0 mg/l và NAA 1,0 mg/l [11]. Bùi Văn Thắng và Nguyễn Thị Hồng Gấm (2017) đã nhân nhanh protocorm trên môi trường Knops bổ sung BAP 0,5 mg/l, NAA 0,5 mg/l, Kinetin 0,3 mg/l, PH 100 ml/l, CW 100 ml/l và sucrose 30 g/l, cho hệ số nhân 16,09 lần/chu kỳ nhân sau 5 tuần nuôi cấy [17].

3.3. Nghiên cứu sự tái sinh chồi từ protocorm

Theo một số nghiên cứu ở hoa Lan, giai đoạn biệt hóa chồi và sinh trưởng chồi thì ngoài các hormone sinh trưởng, để thúc đẩy quá trình nuôi cấy giúp cây sinh trưởng nhanh hơn và có chất lượng tốt hơn, các nghiên cứu thường bổ sung thêm dịch chiết một số loại củ quả như cà rốt, khoai tây, chuối. Dịch chiết củ quả chứa những thành phần không xác định có tác dụng kích thích sự sinh trưởng của mô tế bào [18]. Trong nghiên cứu này chúng tôi nghiên cứu sự tái sinh chồi từ PLBs và sinh trưởng chồi trên môi trường ST1 và ST2. Ở giai đoạn này mục tiêu là biệt hóa và tái sinh chồi, cho nên chúng tôi vừa cân sinh khối vừa đánh giá khả năng tạo chồi. Kết quả thu được ở bảng 5 cho thấy, sau khi nuôi cấy trên hai môi trường ST1 và ST2 khoảng 20 ngày, mẫu đã sinh trưởng rất mạnh tạo khối PLBs to, sau đó bắt đầu phân hóa tạo chồi. Protocorm sinh trưởng rất tốt, biệt hóa tạo chồi có màu xanh nhạt. Tốc độ sinh trưởng protocorm của ST1 và ST2 tương đương nhau nhưng ST2 biệt hóa tạo chồi tốt và sớm hơn ST1.

Sinh khối thu được sau 40 đến 60 ngày nuôi cấy so với ban đầu cho thấy cả hai môi trường ST1 và ST2 đã khác biệt rõ rệt và có ý nghĩa thống kê. Điều này chứng tỏ môi trường nuôi cấy đã ảnh hưởng rõ lên sinh trưởng và biệt hóa của PLBs. Ở lần cấy chuyển thứ nhất, sau 40 ngày nuôi cấy, sinh khối protocorm trên môi trường ST1 và ST2 đạt được tăng so với ban đầu là 4,13 lần và 4,67 lần. Ở lần cấy chuyển thứ 2, trọng lượng protocorm của ST1 và ST2 sau 60 ngày nuôi cấy đạt lần lượt là 14,23 g và 13,15 g, tương ứng hệ số nhân là 5,20 lần và 5,58 lần. Ở lần cấy chuyển 3, sinh khối ST2 tăng đáng kể và đạt cao (26,24 g, tăng 7,65 lần), cao hơn khá nhiều so với ST1 (sinh khối đạt 13,17 g, tăng 4,10 lần). Sau 60 ngày nuôi cấy, protocorm của ST1 sinh trưởng tốt, biệt hóa tạo chồi có màu xanh nhạt, còn môi trường ST2 protocorm sinh trưởng rất tốt, biệt hóa tạo chồi có màu xanh đậm.

Như vậy, sau ba lần cấy chuyển, sinh khối protocorm của ST2 thu được so với ban đầu đều cao hơn so với ST1. Hệ số nhân sau 160 ngày của ST2 là 17,9 lần, còn ST1 đạt là 13,43 lần. Trên cả môi trường ST1 và ST2, hầu hết các tế bào protocorm phía trên biệt hóa tạo chồi hoặc mầm chồi khỏe mạnh, phía dưới vẫn là các cụm protocorm gồm các tế bào nhỏ, có khả năng nhân sinh khối tiếp. Điều quan trọng là có sự khác biệt về khả năng tái sinh và thời gian tái sinh chồi giữa ST1 và ST2. ST2 biệt hóa và tái sinh chồi sớm hơn so với ST1, đồng thời số cụm chồi hình thành từ protocorm cũng nhiều hơn so với ST1 (Hình 3c). Như vậy, thời gian nuôi cấy trên môi trường ST1 và ST2 có thể kéo dài đến 160 ngày với 2 - 3 lần cấy chuyển thì ta thu được các chồi hoặc cụm chồi có 1- 2 lá, cao 1-1,2 cm. Các chồi này được tách ra và cấy chuyển thừa trên môi trường ST cho chồi sinh trưởng đến khi đủ lớn sẽ chuyển sang môi trường ra rễ để ra cây (Hình 3d). Theo Li và Xu (2009), protocorm *Rhynchostylis gigantea* L. được hình thành từ mô sẹo của PLBs khi chuyển sang nuôi cấy trên môi trường MS không có hormone sau 30 ngày nuôi cấy đã biệt hóa phát triển thành chồi có 2-4 lá [8].

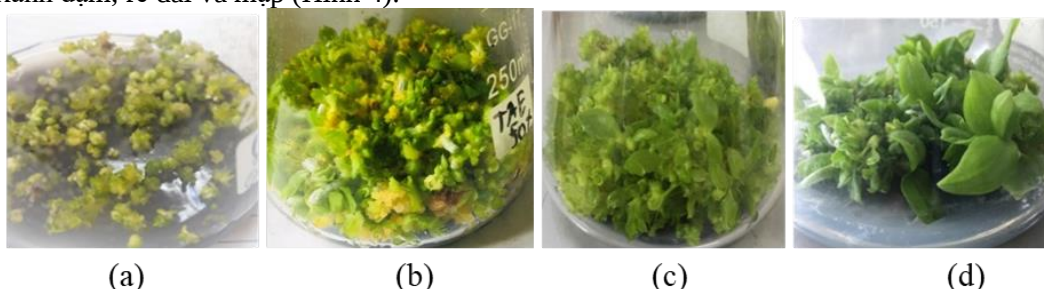
Bảng 5. Sinh khối PLBs trên môi trường tái sinh ST1 và ST2

STT	Môi trường	Thời gian	Trọng lượng PLBs (g)	Tăng so với ban đầu (g)	Hệ số nhân PLBs (lần)	Đặc điểm PLBs và chồi
Lần cấy chuyển 1	ST1	Ban đầu	2,15 a	6,74 ± 2,16	4,13	Protocorm màu vàng nhạt
		40 ngày	8,89 b			Protocorm sinh trưởng rất tốt, màu xanh nhạt
	ST2	Ban đầu	2,21 a	8,12 ± 1,30	4,67	Protocorm màu vàng nhạt
		40 ngày	10,33 b			Protocorm sinh trưởng rất tốt, màu xanh thẫm
Lần cấy chuyển 2	ST1	Ban đầu	2,55 a	11,68 ± 2,40	5,20	Protocorm màu vàng nhạt
		60 ngày	14,23 b			Protocorm sinh trưởng rất tốt, xanh nhạt, ít cụm chồi
	ST2	Ban đầu	2,53 a	10,62 ± 2,34	5,58	Protocorm màu vàng nhạt
		60 ngày	13,15 b			Protocorm sinh trưởng rất tốt, xanh nhạt, nhiều cụm chồi
Lần cấy chuyển 3	ST1	Ban đầu	3,36 a	10,39 ± 4,06	4,10	Protocorm sinh trưởng rất tốt, màu xanh nhạt
		60 ngày	13,76 b			Protocorm sinh trưởng rất tốt, xanh nhạt, nhiều cụm chồi
	ST2	Ban đầu	3,43 a	22,81 ± 2,40	7,65	Protocorm màu vàng nhạt
		60 ngày	26,24 c			Protocorm sinh trưởng rất tốt, xanh đậm, nhiều cụm chồi 1-2 lá
ST1					13,43	
ST2		Hệ số nhân protocorm sau 160 ngày			17,9	

3.4. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ của chồi

Kết quả ở bảng 6 cho thấy, tất cả các môi trường VW bổ sung NAA với nồng độ từ 0,5 mg/l - 2,0 mg/l đã có ảnh hưởng rõ rệt đối với khả năng ra rễ chồi *in vitro*. Các chỉ tiêu sinh trưởng và

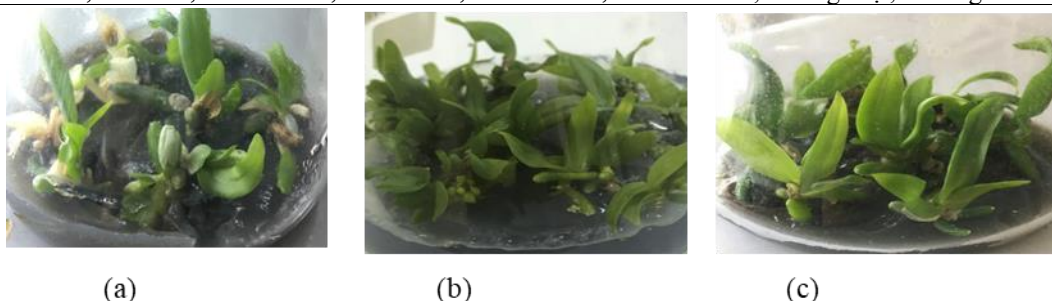
phát triển sau 90 ngày nuôi cấy đều cao hơn so với môi trường đối chứng (ĐC). Môi trường ra rễ có bổ sung nồng độ NAA từ 0,5 mg/l - 2,0 mg/l (R1-R3) cho thấy, nồng độ NAA khác nhau đã ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng ra rễ của chồi. Số rễ/chồi đạt từ 2,17 rễ - 2,83 rễ; chiều dài rễ đạt từ 1,85 cm - 2,33 cm và đều cao hơn so với đối chứng. Trong đó, môi trường R2 (NAA 1,0 mg/l) phù hợp nhất cho ra rễ của chồi với số rễ đạt cao nhất là 4,0 rễ/chồi, chiều dài rễ đạt cao nhất (2,33 cm). Ngoài ra, chồi vẫn tiếp tục sinh trưởng và phát triển tốt, các chỉ tiêu chiều cao và số lá cũng đạt được cao hơn trên môi trường đối chứng. Trong số các môi trường từ R1 đến R3 thì môi trường R2 (môi trường VW có bổ sung nồng độ NAA 1,0 mg/l) cho chồi sinh trưởng tốt nhất, lá to xanh đậm, rễ dài và mập (Hình 4).



Hình 3. Sự biệt hóa và tái sinh chồi từ PLBs trên môi trường ST: (a) Ban đầu; (b) PLBs sau 40 ngày; (c) Cụm chồi tái sinh sau 90 ngày; (d) Chồi Đại châu trưởng thành trên ST2 120 ngày

Bảng 6. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ in vitro của chồi

Môi trường	NAA (mg/l)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)	Đặc điểm chồi
ĐC	0	1,82 a	2,33 a	2,17 a	1,37 a	Nhỏ, lá bé, màu vàng nhạt, rễ ngắn và mảnh
R1	0,5	2,15 ab	3,00 abc	3,17 bc	1,90 b	Nhỏ, lá dài, xanh nhạt, rễ trung bình và mảnh
R2	1,0	2,72 bc	3,63 c	4,00 c	2,33 c	To, lá to và dày, xanh đậm, rễ dài và mập
R3	2,0	2,12 ab	2,83 ab	2,83 ab	1,85 b	Nhỏ, lá vàng nhạt, rễ trung bình và mảnh



Hình 4. Chồi ra rễ và tạo cây hoàn chỉnh trên các môi trường khác nhau sau 90 ngày: (a) Môi trường đối chứng VW; (b) VW + NAA 0,5 mg/l; (c) VW + NAA 1,0 mg/l

Kết quả của chúng tôi cho thấy nồng độ NAA 1,0 mg/l cho hiệu quả kích thích tốt nhất đối với sự ra rễ của chồi (4,0 rễ/chồi) là phù hợp với nghiên cứu của Bakul and Shahinul (2015) nhưng có thể thấp hơn hoặc cao hơn so với một số nghiên cứu khác. Phan Thị Thu Hiền và Nguyễn Văn Đình (2017) cho rằng, nồng độ NAA 1,5 mg/l cho hiệu quả cao nhất với số rễ trung bình 3,67 rễ/chồi. Tuy nhiên, chiều dài rễ thu được cao hơn (3,3 cm), rễ mập, xanh, có nhiều lông tơ [12]. Theo Islam và Bhattacharjee (2015), khi nghiên cứu khả năng ra rễ của chồi *Rhynchostylis retusa* (L.) Blume đã thu được kết quả môi trường $\frac{1}{2}$ MS + IAA 0,5 mg/l và IBA 0,5 mg/l cho số lượng rễ cao nhất (5,8) và chiều dài rễ cao nhất (4,17 cm) [10].

4. Kết luận

Quy trình vi nhân giống lan Đại châu thông qua phát sinh protocorm từ mô sẹo đã được xây dựng thành công. Môi trường MS bổ sung BAP 2,0 mg/l phù hợp cho tạo protocorm từ mô sẹo, tỉ

lệ tạo protocorm 100%. Nhân protocorm trên môi trường P6 (VW bổ sung BAP 1 mg/l, NAA 0,5 mg/l, nước dừa 100 ml/l, khoai tây 40 g/l, chuối tiêu 30 g/l) cho hiệu quả tốt nhất, sinh khối tăng gấp 4,66 lần so với ban đầu. Protocorm được nuôi cấy trên môi trường ST2 (VW bổ sung BAP 1 mg/l, NAA 0,5 mg/l, nước dừa 100 ml/l, khoai tây 40 g/l, chuối tiêu 30 g/l) cho hiệu quả nhân sinh khối PLBs cao (hệ số nhân 17,9 lần) và tái sinh chồi tốt nhất, tạo cụm chồi với các chồi hoàn chỉnh có 1-2 lá thật. Môi trường R2 (VW bổ sung NAA 1,0 mg/l, chuối tiêu 50 g/l) phù hợp nhất cho ra rễ của chồi với số rễ đạt cao nhất 4,0 rễ/chồi, chiều dài rễ đạt cao nhất (2,33 cm).

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] T. D. Dinh, V. D. Dang, and D. Q. Tran, "Effect of The Ecological Regions and Gibberellic Acid (GA3) Application on Growth and Flower Development of *Rhynchostylis gigantea* (Lindley) Rindley," (In Vietnamese), *J. Sci. & Devel.*, vol. 12, no. 7, pp. 1049-1057, 2014.
- [2] V. L. Bui, N. T. H. Phuong, L. T. A. Hong, and K. T. V. Tran, "High frequency shoot regeneration from *Rhynchostylis gigantea* (orchidaceae) using thin cell layers," *Plant Growth Regulation*, vol. 28, pp. 179-185, 1999.
- [3] P. Pathak, S. Verma, A. Prakash, and K. C. Mahant, "Regeneration competence of an ornamentally important epiphytic orchid, *Rhynchostylis gigantea* (LINDL.) RIDL. Through leaf segments: A study in vitro.," *J. Orchid Soc. India*, vol. 31, pp. 97-101, 2017.
- [4] J. T. Chen and W. C. Chang, "Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae)," *Plant Sci*, vol. 160, pp. 87-93, 2000.
- [5] Y. Ishii, T. Takamura, M. Goi, and M. Tanaka, "Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*," *Plant Cell Rep*, vol. 17, pp. 446-450, 1998.
- [6] K. Tokuhara and M. Mii, "Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae)," *In Vitro Cell Devl Biol*, vol. 37, pp. 457-461, 2001.
- [7] J. T. Chen and W. C. Chang, "Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. *misericors*," *Plant Cell Rep*, vol. 17, pp. 251-255, 1998.
- [8] Z. Y. Li and L. Xu, "In vitro propagation of white-flower mutant of *Rhynchostylis gigantea* (Lindl.) Ridl. through immature seed-derived protocorm-like bodies," *J Horti For*, vol. 1, no. 6, pp. 093-097, 2009.
- [9] R. Suphat, T. Sompong, K. Nattaporn, and K. Soisiri, "Micropropagation of Chang Daeng (*Rhynchostylis gigantea* var. *Sagarik*) by embryogenic callus," *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, vol. 33, no. 6, pp. 659-663, 2011.
- [10] S. M. S. Islam and B. Bhattacharjee, "Plant regeneration through somatic embryogenesis from leaf and root explants of *Rhynchostylis retusa* (L.) Blume," *Appl Biol Res*, vol. 17, no. 2, pp. 158-165, 2015.
- [11] B. Bakul and S. M. I. Shahinul, "The effect of PGRs on in vitro development of protocorms, regeneration and mass multiplication derived from immature seeds of *Rhynchostylis retusa* (L.) Blume," *Global J. Biol. Biotech.*, vol. 4, no. 1, p. 121, 2015.
- [12] T. T. H. Phan and V. D. Nguyen, "In vitro propagation of (*Rhynchostylis gigantea* L.) orchid", (In Vietnamese), *VNU journal of science: Natural science and technology*, vol. 33, no. 1, pp. 48-57, 2017.
- [13] V. M. Tran, "Micropropagation of *Rhynchostylis gigantea* orchid by somatic embryogenic cultures," *CBU International Conference Proceedings*, Prague, Czech Republic, 2019, vol. 7, pp. 969-974.
- [14] T. Murashige and F. Skoog, "A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures," *Physiol Plant*, vol. 15, pp. 473-497, 1962.
- [15] E. F. Vacin and E. W. Went, "Some pH changes in nutrient solutions," *Bot Gaz*, vol. 110, pp. 605-613, 1949.
- [16] G. V. Parab and S. Krishnan, "Rapid in vitro mass multiplication of orchids *Aerides maculosa* Lindl. and *Rhynchostylis retusa* (L.) Bl. from immature seeds," *Indian Journal of Biotechnology*, vol. 11, pp. 288-294, 2012.
- [17] V. T. Bui and T. H. G. Nguyen, "Clonal propagation of *Rhynchostylis retusa* (L.) Blume from immature seeds by in vitro culture," (In Vietnamese), *Vietnam Agricultural Science and Technology Journal*, vol. 79, no. 6, pp. 25-29, 2017.
- [18] T. T. Dang, N. B. H'Yon, T. T. H. Nguyen, V. K. Dinh, V. D. Nong, T. V. Tran, V. H. Quach, and K. C. Vu, "Micropropagation of *Dendrobium heterocarpum* Lindl.," (In Vietnamese), *Journal of Biotechnology*, vol. 16, pp. 127-135, 2018.