

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* LAN THẠCH HỘC TÍA (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)

Trịnh Thị Thúy An*, Nguyễn Thị Tâm
Trường Đại học Sư phạm – ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Lan Thạch hộc tía (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) là loài lan mang nhiều chất có hoạt tính sinh học quý được sử dụng làm thuốc, làm thực phẩm, làm cảnh có giá trị kinh tế cao. Thạch hộc tía có khả năng sinh sản và sức sống yếu. Kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật được ứng dụng có hiệu quả trong nhân giống lan Thạch hộc tía. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, môi trường tốt nhất cho khả năng tạo protocorm và nhân nhanh chồi là MS cơ bản bổ sung sucrose 30 g/l, agar 9 g/l, nước dừa 100 ml/l và BAP 0,25 mg/l. Môi trường thích hợp cho khả năng tạo rễ của lan Thạch hộc tía là MS cơ bản bổ sung sucrose 30 g/l, agar 9 g/l, nước dừa 100 ml/l và NAA 0,9 mg/l.

Từ khóa: BAP, *in vitro*, kinetin, lan Thạch hộc tía, nhân giống.

MỞ ĐẦU

Lan Thạch hộc tía thường phân bố ở vùng núi đá vôi, là loài cây dược liệu quý hiếm được sử dụng rộng rãi trong các bài thuốc chống ung thư, chữa tiểu đường, cao huyết áp [4]. Ngoài ra, lan Thạch hộc tía còn là loài cây cảnh, loại thực phẩm tốt có giá trị kinh tế cao. Thạch hộc tía khó sinh sản, mọc chậm, khó trồng. Nuôi cấy mô tế bào thực vật với nhiều ưu điểm trong nhân giống là giải pháp để bảo tồn và phát triển các giống lan. Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu môi trường nhân giống lan Thạch hộc tía bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mô giống lan Thạch hộc tía được nuôi cấy trong môi trường sạch bệnh do Trung tâm Thực nghiệm – Viện Công nghệ Sinh học cung cấp.

Môi trường nuôi cấy: Tất cả môi trường nuôi cấy thí nghiệm đều sử dụng nền môi trường MS cơ bản có bổ sung sucrose 30 g/l, agar 9 g/l, nước dừa 100 ml/l và chất kích thích sinh trưởng.

Môi trường nhân chồi: Sử dụng khối mô chưa biệt hóa cấy vào môi trường nhân nhanh chồi bổ sung BAP với các nồng độ 0,25; 0,5; 0,75;

1 mg/l hoặc kinetin với các nồng độ 0,25; 0,5; 0,75; 1,00 mg/l. Môi trường tạo rễ: MS cơ bản bổ sung NAA với các nồng độ 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,1 mg/l.

Đối chứng (ĐC) là môi trường MS cơ bản có bổ sung sucrose 30 g/l, agar 9 g/l, nước dừa 100 ml/l và không bổ sung chất kích thích sinh trưởng.

Phương pháp xử lý số liệu kết quả nghiên cứu bằng phần mềm Excel theo Chu Văn Mẫn [2].

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả nhân chồi lan Thạch hộc tía *in vitro*

Tế bào bất kỳ của cơ thể sinh vật đa bào nào cũng đều có khả năng phát triển thành cơ thể hoàn chỉnh khi gặp điều kiện thuận lợi. Tế bào thực vật có khả năng phân chia, phân hóa cơ quan và tái sinh thành cây trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* [3]. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng vật liệu ban đầu là khối mô chưa biệt hóa để nghiên cứu quá trình tạo đa chồi lan Thạch hộc tía. BAP và kinetin là những chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin, có vai trò kích thích sự phân chia tế bào, làm chậm quá trình già hóa của tế bào, ở mức độ cơ thể có tác dụng thúc đẩy sự tạo chồi của cây. Chúng tôi lựa chọn sử dụng BAP và kinetin để nghiên cứu ảnh hưởng tới sự tạo chồi và protocorm.

* Tel: 0986024752; Email: an.haruka95@gmail.com

Bảng 1. Ảnh hưởng của BAP tới sự tạo chồi và protocorm của lan Thạch học tía (sau 6 tuần)

Nồng độ BAP (mg/l)	Tỉ lệ tạo protocorm (%)	Số chồi/mô	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi
ĐC	54,16	2,25 ± 0,12	0,45 ± 0,02	1,93 ± 0,07
0,25	77,50	2,95 ± 0,12	0,69 ± 0,02	2,56 ± 0,09
0,50	74,16	2,78 ± 0,11	0,66 ± 0,02	2,52 ± 0,10
0,75	67,50	2,60 ± 0,11	0,63 ± 0,02	2,38 ± 0,10
1,00	64,16	2,53 ± 0,10	0,56 ± 0,02	2,03 ± 0,10

Bảng 2. Ảnh hưởng của kinetin tới sự tạo chồi và protocorm của lan Thạch học tía (sau 6 tuần)

Nồng độ kinetin (mg/l)	Tỉ lệ tạo protocorm (%)	Số chồi/mô	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi
ĐC	50,83	2,12 ± 0,08	0,40 ± 0,02	1,85 ± 0,08
0,25	74,17	2,80 ± 0,10	0,62 ± 0,02	2,47 ± 0,08
0,5	65,83	2,73 ± 0,10	0,61 ± 0,01	2,42 ± 0,11
0,75	63,33	2,78 ± 0,10	0,59 ± 0,02	2,24 ± 0,11
1,0	61,67	2,48 ± 0,09	0,53 ± 0,02	1,98 ± 0,09

Ảnh hưởng của BAP tới sự tạo chồi và protocorm của lan Thạch học tía

Bảng 1 cho thấy, ở môi trường bổ sung BAP nồng độ 0,25 mg/l khả năng tạo protocorm đạt tỉ lệ cao nhất là 77,50%. Khi nồng độ BAP bổ sung trong môi trường nuôi cấy tăng dần thì khả năng tạo protocorm giảm dần. Với môi trường đối chứng không bổ sung BAP, tỉ lệ mô tạo protocorm thấp hơn so với các công thức có bổ sung BAP ở các nồng độ khác nhau. Tỉ lệ mô tạo protocorm ở mẫu đối chứng chỉ đạt 54,16%.

Đối với chiều cao chồi, ở môi trường có nồng độ BAP 0,25 mg/l các mô có chiều cao chồi trung bình lớn nhất là 0,69 cm. Đối với môi trường đối chứng không bổ sung BAP thì chiều cao chồi trung bình ở các mô thấp hơn các công thức có bổ sung BAP. Khi nồng độ BAP trong môi trường tăng dần thì chiều cao chồi trung bình giảm dần.

Xét đồng thời các chỉ tiêu nghiên cứu khác cũng cho ra kết quả tương tự. Vậy chúng tôi đánh giá môi trường thích hợp cho việc nhân nhanh lan Thạch học tía *in vitro* là môi trường MS bổ sung BAP nồng độ 0,25 mg/l.

Ảnh hưởng của kinetin tới sự tạo chồi và protocorm của lan Thạch học tía

Theo dẫn liệu ở bảng 2 cho thấy, khả năng tạo protocorm đạt tỉ lệ cao nhất ở môi trường bổ

sung kinetin nồng độ 0,25 mg/l là 74,17%. Khi nồng độ kinetin bổ sung trong môi trường nuôi cấy tăng dần thì khả năng tạo protocorm giảm dần. Với môi trường đối chứng không bổ sung kinetin, tỉ lệ mô tạo protocorm thấp hơn so với các công thức có bổ sung kinetin ở các nồng độ khác nhau.

Đối với chiều cao chồi, ở môi trường có nồng độ kinetin 0,25 mg/l các mô có chiều cao chồi trung bình lớn nhất là 0,62 cm. Đối với môi trường đối chứng thì chiều cao chồi trung bình ở các mô thấp hơn các công thức có bổ sung kinetin và chiều cao chồi giảm dần khi nồng độ kinetin trong môi trường tăng dần.

Nghiên cứu đồng thời các chỉ tiêu nghiên cứu khác cũng cho ra kết quả tương tự. Vậy chúng tôi đánh giá môi trường thích hợp cho việc nhân nhanh lan Thạch học tía *in vitro* là môi trường MS bổ sung BAP nồng độ 0,25 mg/l.

So sánh khả năng tạo protocorm và phát sinh chồi của lan Thạch học tía khi sử dụng hai loại chất kích thích sinh trưởng là BAP và kinetin trên nền môi trường MS cho thấy tỉ lệ tạo protocorm và phát sinh chồi khi sử dụng bổ sung nồng độ BAP 0,25 mg/l cao hơn khi sử dụng kinetin 0,25 mg/l. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn bổ sung BAP ở nồng độ 0,25 mg/l với mục đích nhân nhanh lan Thạch học tía trong ống nghiệm.



Đối chứng



BAP 0,25 mg/l



Kinetin 0,25 mg/l

Hình 1. So sánh ảnh hưởng của BAP và kinetin đến sự tạo chồi và protocorm ở lan Thạch học tía**Kết quả tạo rễ lan Thạch học tía *in vitro***

Ảnh hưởng của NAA tới sự phát sinh rễ của lan Thạch học tía trong ống nghiệm

NAA là chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm auxin. NAA có tác dụng thúc đẩy sự sinh trưởng và giãn nở của tế bào thực vật, tăng cường quá trình tổng hợp và trao đổi chất.... Ngoài ra nó còn kích thích sự ra rễ, kéo dài rễ và tham gia vào cảm ứng phát sinh chồi vô tính [1].

Kết quả bảng 3 cho thấy, môi trường bổ sung nồng độ NAA 0,9 mg/l có tỉ lệ ra rễ cao nhất (86,67% sau 6 tuần nuôi cấy), số rễ trung bình

trên một cây cũng nhiều nhất (1,70 rễ/chồi sau 6 tuần nuôi cấy). Môi trường ĐC có tỉ lệ tạo rễ thấp (40,83% sau 6 tuần nuôi cấy) và số rễ trung bình trên cây nhỏ (0,33 rễ/cây sau 6 tuần nuôi cấy). Khi tăng dần nồng độ NAA bổ sung vào môi trường từ 0,3 mg/l đến 0,9 mg/l thì các chỉ số như tỉ lệ chồi tạo rễ, số rễ/chồi, chiều dài trung bình rễ cũng tăng dần, tuy nhiên khi nồng độ NAA 1,1 mg/l bổ sung vào môi trường thì các chỉ số đều giảm.

Như vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi đánh giá nồng độ NAA thích hợp cho sự phát sinh rễ của lan Thạch học tía là môi trường có bổ sung NAA với nồng độ 0,9 mg/l.

Bảng 3. Ảnh hưởng của NAA tới sự phát sinh rễ của lan Thạch học tía trong ống nghiệm

Nồng độ NAA (mg/l)	Tỉ lệ chồi tạo rễ (%)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)
ĐC	40,83	0,33 ± 0,08	0,25 ± 0,02
0,3	61,67	0,93 ± 0,10	0,59 ± 0,02
0,5	70,83	0,97 ± 0,10	0,63 ± 0,02
0,7	80,83	1,35 ± 0,10	0,68 ± 0,01
0,9	86,67	1,70 ± 0,10	0,73 ± 0,01
1,1	83,33	1,47 ± 0,10	0,68 ± 0,02



Đối chứng



NAA 0,9 mg/l

Hình 2. Ảnh hưởng của NAA đến sự phát sinh rễ ở lan Thạch học tía

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu của chúng tôi, môi trường cơ bản MS + sucrose 30 g/l + agar 9 g/l + nước dừa 100 ml/l và bổ sung BAP 0,25 mg/l thích hợp cho khả năng tạo protocorm và phát sinh chồi của lan Thạch hộc tía. Môi trường cơ bản MS + sucrose 30 g/l + agar 9 g/l + nước dừa 100 ml/l và bổ sung NAA 0,9 mg/l thích hợp cho khả năng tạo rễ của lan Thạch hộc tía.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Trần Bình, Hồ Hữu Nhị, Lê Thị Muội (1997), *Công nghệ sinh học thực vật trong cải tiến giống cây trồng*, Nxb Nông nghiệp Hà Nội.
2. Chu Văn Mẫn (2000), *Ứng dụng tin học trong sinh học*, Nxb Đại học Quốc gia Hà Nội.
3. Đỗ Năng Vịnh, Ngô Xuân Bình (2008), *Giáo trình Công nghệ sinh học đại cương*, Nxb Nông nghiệp.
4. Chu Chu, Huimin Yin, Li Xia, Dongping Cheng, Jizhong Yan, and Lin Zhu (2014), "Discrimination of *Dendrobium officinale* and Its Common Adulterants by Combination of Normal Light and Fluorescence Microscopy", *Molecules*, 19(3): pp. 3718-3730.

SUMMARY**RESEARCH IN MICROPROPAGATION OF *DENDROBIUM OFFICINALE* KIMURA ET MIGO**

Trình Thị Thúy An*, Nguyễn Thị Tam
College of Education - TNU

Dendrobium officinale Kimura et Migo is a orchid contains precious bioactive compounds used in medicine, food and ornaments with high economic value. *Dendrobium officinale* Kimura et Migo has weak reproductiveness and vitality. Plant tissue culture has been effectively applied in *Dendrobium* propagation. The *in vitro* result showed that the most appropriate environment to create protocorm and shoot multiplication was MS medium supplemented sucrose 30 grs/l; agar 9 grs/l; coconut water 100 ml/l and BAP 0.25 mg/l. The appropriate environment for rooting ability of *Dendrobium* was MS medium supplemented sucrose 30 grs/l; agar 9 grs/l; coconut water 100 ml/l and NAA 0.9 mg/l.

Keywords: BAP, *Dendrobium officinale* Kimura et Migo, *in vitro*, kinetine, micropropagation.

Ngày nhận bài: 24/11/2016; Ngày phản biện: 04/12/2016; Ngày duyệt đăng: 24 /01/2017
Phản biện khoa học: TS. Nguyễn Thị Thu Nga - Trường ĐH Sư phạm - ĐHTN

* Tel: 0986024752. Email: an.haruka95@gmail.com