

ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT ĐIỀU HÒA SINH TRƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG TẠO CHỒI VÀ CỤM CHỒI LAN KIM TUYẾN NUÔI CÂY IN VITRO

Nguyễn Minh Ty⁽¹⁾, Nguyễn Vinh Hiền⁽¹⁾

(1) Trường Đại học Thủ Dầu Một

Ngày nhận bài 17/05/2020; Ngày gửi phản biện 20/05/2010; Chấp nhận đăng 25/07/2020

Liên hệ email: hiennv@tdmu.edu.vn

<https://doi.org/10.37550/tdmu.VJS/2020.04.054>

Tóm tắt

Lan Kim tuyến (Anoectochilus roxburghii) là loài đang nguy cấp, thuộc nhóm IA nghị định 32/2006/CP cần được bảo tồn. Việc tái sinh và nhân giống từ số lượng ít ỏi những cá thể còn lại là rất cần thiết để bảo tồn và phát triển cây dược liệu quý này. Trong nghiên cứu này, qui trình nhân giống in vitro cây lan Kim tuyến sử dụng từ đốt thân chứa chồi ngủ, nuôi cấy trên môi trường nền tối ưu là MS + 0,3mg/l kinetin + 1mg/l BA + 0,1mg/l TDZ, bổ sung các chất dinh dưỡng khác để cảm ứng tạo chồi. Tỷ lệ mẫu tạo chồi đạt 87% sau 45 ngày nuôi cấy. Tỷ lệ tạo cụm chồi là 80,05%, số chồi trên cụm là 9,2 chất lượng chồi rất tốt trên môi trường MS^{1/2}, bổ sung 20g/l sucrose, kết hợp 0,4mg/l Kinetin + 1mg/l BA + 0,2mg/l TDZ. Chiều cao chồi đạt 8cm, số đốt là 6,5 đốt/thân trên môi trường MS^{1/2} kết hợp 1,0mg/l BA và 0,5mg/l αNAA.

Từ khóa: lan Kim tuyến, nhân nhanh, nuôi cấy in vitro, tái sinh chồi

Abstract

EFFECTS OF PLANT GROWTH REGULATION ON THE SHOOT FORMATION AND MULTIPLY FAST BUD CLUSTERS OF THE ANOECTOCHILUS ROXBURGHII (WALL) LINDL IN VITRO CULTURE

The effects of plant growth regulators on in vitro shoot formation and bud clusters of Anoectochilus roxburghii were investigated. Shoots cultured from trunk node containing sleeping shoots on MS medium with 0.3mg/l kinetin and 1mg/l BA and 0.1mg/l TDZ, add other nutrients to arouse shoot formation. The rate of shoot creation reached 87%, after 45 days of culture. The rate of shoot formation was 80.05%, the number of shoots on the cluster was 9.2 very good quality of shoots on MS^{1/2} medium, supplemented with 20g/l sucrose, combined 0.4mg/l Kinetin and 1mg/l BA and 0.2mg/l TDZ. Shoot height was about 8cm, number node of shoots was 6.5 on MS^{1/2} medium with 1.0mg/l BA and 0.5mg/l αNAA.

1. Đặt vấn đề

Lan Kim tuyến thuộc họ Orchidaceae, trên thế giới đã thống kê hơn 40 loài, phân bố rộng khắp châu Á (Teuscher, 1978); ở Việt Nam phát hiện được 12 loài, phân bố từ Bắc đến Nam (Phạm Hoàng Hộ, 2000), là loài đang nguy cấp xếp vào nhóm IA Nghị định

32/2006/NĐ-CP. Trong tự nhiên khả năng tái sinh chồi của lan Kim tuyến kém, cây sinh trưởng chậm. Đây là cây dược liệu, làm rau ăn và chữa được nhiều bệnh (tim mạch, các bệnh sung viêm, có hoạt chất chống oxy hóa bảo vệ gan, trị đau nhức khớp, lao phổi và tăng cường sức khỏe) (Mak, Huan và Law, 1990; Huang, Law và Mak, 1991; Lin, Lin, Chiu, Yang và Lee, 1993; Du, Yoshizawa, tamura, Mohri, Yoshizawa, Irio, Hayashi and Shoyama, 2001). Đây cũng là lý do người dân khai thác lan Kim tuyến kiệt quệ. Đến nay có một số công trình nghiên cứu về nhân giống *in vitro* lan Kim tuyến thuộc chi *Anoectuchilus*: Ket, Chakrabarty, hahn and Paek, (2003, 2004); Nhut, Don, Vu, Thien, Thuy, Duy và Teixeira da Silva, (2006); Phùng Văn Phê, Nguyễn Thị Hồng Gấm Nguyễn Trung Thành (2010); Nguyễn Quang Thạch và Phí Thị Cẩm Miện (2012); Nguyễn Tuấn Anh, Phan Ngọc Khoa, Trương Thị Bích Phượng (2013). Tuy nhiên, việc đáp ứng được số lượng lớn cung cấp cho thị trường thương mại cây dược liệu này hiện tại vẫn chưa đủ. Vì vậy, đề tài nghiên cứu này thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng Kinetin, BA và TDZ đến khả năng tái sinh chồi và cụm chồi đồng thời tăng hiệu quả nhân giống vô tính của lan Kim tuyến trong nuôi cấy *in vitro*.

2. Vật liệu và phương pháp

Vật liệu: Nguồn mẫu sử dụng cho nghiên cứu là đốt thân lan Kim tuyến chứa chồi ngủ với chiều dài của đốt là 2cm được thu thập trong tự nhiên, không nhiễm bệnh, sinh trưởng tốt.

Khử trùng mẫu: Mẫu lan Kim tuyến thu ngoài tự nhiên được rửa sạch bằng nước xà phòng sau đó rửa lại bằng nước cất 3 lần, sau đó cắt bỏ hết lá lấy phần chồi sinh trưởng. Mẫu được xử lý bằng cồn 70⁰ trong 10 phút, rửa lại bằng nước cất 3 lần, sau đó xử lý trong dung dịch NaOCl 2% trong 12 phút, rửa lại bằng nước cất 5 lần trước khi đưa vào môi trường nuôi cấy.

Cảm ứng tái sinh chồi *in vitro*: Các đốt thân chứa chồi ngủ lan Kim tuyến được nuôi cấy trong môi trường MS và vitamin (Murashige và Skoog, 1962); Dương Công Kiên, 2003 bổ sung 100ml/l nước dừa, 20g/l sucrose, 2g/l agar, 1g/l than hoạt tính, 0,3mg/l Kinetin kết hợp 1mg/l BA và 0,1mg/l TDZ, pH = 5,8 cảm ứng tạo chồi. Tỷ lệ phát triển chồi được đánh giá sau 45 ngày nuôi cấy.

Nhân nhanh cụm chồi *in vitro*: Chồi tái sinh từ mẫu cấy tách ra với chiều cao trung bình 2cm, 1-2 lá mầm trên môi trường cảm ứng tạo chồi được chuyển sang môi trường nhân nhanh MS½, với BA ở các nồng độ khác nhau, 100ml/l nước dừa, 20g/l sucrose, 2g/l agar, 1g/l than hoạt tính, bổ sung vitamin B₁. Các chồi được cấy chuyển sang môi trường mới sau 40 ngày 1 lần.

Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu: Thí nghiệm bố trí ba lần lặp lại. Các chỉ tiêu theo dõi được quan sát và đo đếm sau 45 ngày đối với các thí nghiệm vào mẫu và 40 ngày đối với các thí nghiệm nhân nhanh. Số liệu xử lý thống kê theo chương trình MicroSoft Excel và (Dacum, 1995) với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tạo vật liệu khởi đầu

Ảnh hưởng của Kinetin, BA và TDZ đến khả năng tái sinh chồi lan Kim tuyến:
 Đánh giá khả năng tái sinh chồi từ đoạn thân chứa đốt ngủ nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung các loại Cytokinin (Kinetin, BA và TDZ) ở các nồng độ khác nhau sau 45 ngày nuôi cấy. Kết quả đã cho thấy ở nghiệm thức đối chứng với (0,3mg/l Kinetin) chỉ có 52% mẫu cảm ứng tạo chồi, chất lượng chồi kém, chồi ngắn (Hình 1A). Khi tăng nồng độ BA lên 0,5mg/l, tỷ lệ mẫu tạo chồi chiếm 71%, chồi to dần (Hình 1B). Khi tăng nồng độ BA 1mg/l, tỷ lệ mẫu tạo chồi cao nhất đạt là 87%, chất lượng chồi rất tốt, to khỏe, số chồi 2-4 chồi trên mẫu cấy (hình 1D) so với các nghiệm thức khác. Chứng tỏ BA có ảnh hưởng rõ đến sự sinh trưởng của lan Kim tuyến. Tuy nhiên, khi nồng độ BA tăng lên 1,5-2,0mg/l, tỷ lệ mẫu tạo chồi giảm, chất lượng chồi kém (hình 1C). Nồng độ BA tăng 1,5mg/l tỷ lệ tái sinh chồi giảm xuống còn 72%, chất lượng chồi kém, ở nồng độ 2,0mg/l BA tỷ lệ tạo chồi chiếm 68% chồi sinh trưởng còi cọc, có hiện tượng già hóa (bảng 1). Như vậy, môi trường tái sinh chồi lan Kim tuyến hiệu quả nhất là MS + 0,3 mg/l kinetin + 1mg/l BA + 0,1mg/l TDZ.

Bảng 1. Ảnh hưởng của Kinetin, BA và TDZ đến khả năng tái sinh chồi lan Kim tuyến sau 45 ngày nuôi cấy.

Kinetin (mg/l)	BAP (mg/l)	TDZ (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chất lượng chồi
0,3	0,0	0,0	52%	2,10	+
0,3	0,5	0,1	71%	3,21	+++
0,3	1,0	0,1	87%	4,22	++++
0,3	1,5	0,1	79%	3,25	+++
0,3	2,0	0,1	72%	3,11	+++
CV(%)			2,20	3,94	
LSD _{0,05}			3,81	0,16	

Ghi chú: +: Chồi phát triển kém; ++: Chồi phát triển trung bình; +++: Chồi phát triển tốt; ++++: Chồi phát triển rất tốt.

Ảnh hưởng của thời gian cấy chuyền đến khả năng tái sinh chồi lan Kim tuyến:

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian cấy chuyền đến khả năng tái sinh chồi

Thời gian khảo sát	25 ngày	35 ngày	45 ngày
Tỷ lệ tạo chồi (%)	33%	48%	73%

Ngoài môi trường nuôi cấy và nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng thì thời gian cấy chuyền có ảnh hưởng quyết định trong việc nhân nhanh chồi và cụm chồi. Kết quả bảng 2 cho thấy, thời gian 25 ngày sau khi cấy chuyền mẫu bắt đầu tạo chồi con nhưng tỷ lệ tạo chồi thấp, tỷ lệ tạo chồi tăng dần theo thời gian 35 ngày, tỷ lệ tạo chồi cao nhất đến ngày thứ 45 đạt 73% và không tiếp tục tăng đến thời gian 60 ngày. Như vậy thời gian thích hợp cấy chuyền mẫu giai đoạn tái sinh là 45 ngày (bảng 2).

3.2. Nhân nhanh chồi và cụm chồi

Ảnh hưởng của BA, Kinetin và TDZ đến khả năng nhân nhanh tạo chồi và cụm chồi:

Từ kết quả bảng 3 cho thấy, trên môi trường MS^{1/2} khả năng tạo cụm chồi với số lượng chồi cao so với giai đoạn tái sinh chồi, thấp nhất là 6,42 chồi và cao nhất là 9,97 chồi (Hình 1 G, F). Đặc điểm chồi nhỏ, phát triển kém. Trong nghiên cứu này chúng tôi nhận thấy hình dạng thể chồi giống PLB_s và phát triển tốt ở môi trường chứa 0,3mg/l TDZ kết hợp 1mg/l BA và 0,5mg/l Kinetin. Sự kết hợp giữa TDZ và Kinetin làm cho chất lượng và số lượng chồi được cải thiện đáng kể so với môi trường không chứa Kinetin. Ở môi trường nồng độ Kinetin 0,4mg/l và TDZ 0,2mg/l, chồi phát triển với kích thước tăng dần, to khỏe (hình 1E, H). Khi nồng độ Kinetin tăng vượt quá 0,4mg/l Kinetin cụm chồi phát triển chậm lại và bắt đầu có hiện tượng hình thành PLB_s và mô sẹo (Calus).

Bảng 3. Ảnh hưởng của BA, Kinetin và TDZ đến khả năng tạo cụm chồi

Kinetin (mg/l)	BAP (mg/l)	TDZ (mg/l)	Số chồi/cụm	Tỷ lệ %	Chất lượng chồi
0,0 mg/l	1,0 mg/l	0,1 mg/l	6,42	67,25%	++
0,2 mg/l	1,0mg/l	0,2mg/l	7,41	73,33%	+++
0,4 mg/l	1,0mg/l	0,2 mg/l	9,20	80,05%	++++
0,5 mg/l	1,0mg/l	0,3 mg/l	9,65	85,10%	+++
0,7 mg/l	1,0mg/l	0,3mg/l	9,97	86,32%	++
CV(%)			3,47	2,83	
LSD _{0,05}			0,19	3,75	

Ghi chú: ++: Chồi phát triển trung bình; +++: Chồi phát triển tốt; ++++: Chồi phát triển rất tốt.

Quá trình nhân PLB_s, mô sẹo tạo hệ số nhân nhanh cao, nhưng với việc tạo cụm chồi trong các nghiệm thức này cần được kiểm soát nghiêm ngặt, ức chế quá trình hình thành Protocom ngược lại, đồng thời tránh sự xuất hiện biến dị trong quá trình nhân nhanh nhiều lần, ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của chồi và giai đoạn ra rễ tiếp theo. Trong nghiên cứu này TDZ có vai trò quan trọng trong sự phát triển của chồi và hình thành chồi bên với nồng độ thích hợp từ 0,1-1,0mg/l, ở nồng độ 0,2-0,3mg/l TDZ số lượng chồi/cụm cao đạt 9,2 (chất lượng chồi rất tốt) và 9,65 (chất lượng chồi tốt). Khi nồng độ TDZ tăng lên 0,7mg/l, tỷ lệ hình thành chồi bên giảm dần và bắt đầu tạo rễ. Vậy môi trường tạo cụm chồi thích hợp nhất là MS^{1/2} + 0,4mg/l Kinetin + 1mg/l BA + 0,2mg/l TDZ cho tỷ lệ tạo cụm chồi là 80,05%, số chồi trên cụm là 9,2 chất lượng chồi rất tốt (hình 1H).

Ảnh hưởng của BA, NAA lên sự sinh trưởng và phát triển của chồi lan Kim tuyến:

Bảng 4. Ảnh hưởng của BA và αNAA đến sự sinh trưởng và phát triển chồi lan Kim tuyến

BA (mg/l)	NAA (mg/l)	Chiều cao chồi (cm)	Số đốt/mẫu	Chất lượng chồi
0,5	0,0	6,3	4,7	++
0,7	0,3	6,9	5,5	+++
1,0	0,5	8,0	6,5	++++
2,0	0,8	6,7	5,1	+++
2,5	1,0	6,1	3,8	++
CV%		4,23	3,16	
LSD _{0,05}		0,28	0,22	

Ghi chú: ++: Chồi phát triển trung bình; +++: Chồi phát triển tốt; ++++: Chồi phát triển rất tốt.

Sự kết hợp BA và α NAA ở các nồng độ khác nhau trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ cho thấy tốc độ phát triển của chồi lan Kim tuyến thể hiện rõ rệt ở nghiệm thức đối chứng nồng độ BA (0,5mg/l) và α NAA (0,0mg/l), chiều cao chồi chỉ đạt 6,3cm, số đốt/mẫu 4,7 đốt, chất lượng chồi trung bình (hình 1I). Khi tăng nồng độ BA (0,7mg/l) và α NAA (0,3mg/l), chồi phát triển dài ra, to dần, số đốt tăng lên 5,5 đốt/mẫu, chất lượng chồi tốt (hình 1J, K). Ở nồng độ BA (1mg/l) và α NAA (0,5mg/l), chiều cao chồi tăng rõ 8cm, có 6,5 đốt, chất lượng chồi rất tốt chồi to, khỏe phát triển nhanh tăng kích thước, lá to (hình 1L). Tăng nồng độ BA lên (2,0-2,5mg/l) và α NAA (0,8-1,0mg/l) chất lượng chồi bắt đầu giảm, chồi ngắn và nhỏ, số đốt ít hơn (bảng 4). Như vậy auxin đóng vai trò quan trọng trong việc điều khiển sự tăng trưởng, tùy thuộc vào việc bổ sung auxin ở nồng độ khác nhau mà tốc độ sinh trưởng, phát triển của lan Kim tuyến có sự thay đổi đáng kể. Sự kết hợp giữa auxin và cytokinin lên quá trình sinh trưởng và phát triển chồi lan Kim tuyến cũng được Shiau, Abhay, Chen, Yang và Tsay, (2002) nghiên cứu và cho biết sự phát triển của chồi lan Kim tuyến tốt nhất trên môi trường bổ sung 1,0-2,0 mg/l BA và 0,5 mg/l α NAA. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ α NAA lên càng cao thì chất lượng chồi càng thấp, Bắt đầu hình thành hệ rễ, cây còi cọc, chậm lớn và có dấu hiệu già hóa. Auxin chỉ cần thiết để phân biệt hóa tế bào và làm xuất hiện chồi mầm trong giai đoạn đầu của sự hình thành chồi, cơ quan và phôi vô tính. Sự hiện diện của auxin ở nồng độ cao sẽ ức chế quá trình kéo dài rễ diễn ra sau đó.



Hình 1. Các giai đoạn tái sinh chồi, nhân nhanh, sinh trưởng của lan Kim tuyến trong nuôi cấy in vitro

4. Kết luận

Khử trùng mẫu: Nồng độ còn 70⁰ xử lý mẫu trong 10 phút, kết hợp NaOCl 2% thời gian 12 phút cho quá trình khử trùng bề mặt đốt thân chứa chồi ngủ của lan Kim tuyến.

Tái sinh chồi từ đốt thân chứa chồi ngủ trên môi trường MS: Đốt thân chứa chồi ngủ sau khi khử trùng được cấy trên môi trường nền tối ưu là MS + 0,3 mg/l kinetin + 1mg/l BA + 0,1mg/l TDZ, bổ sung 20g/l sucrose, 2g/l agar, 1g/l than hoạt tính để cảm ứng tạo chồi sau 45 ngày nuôi cấy. Tỷ lệ mẫu tạo chồi đạt 87%.

Nhân đa chồi trên môi trường MS^{1/2}: Các chồi tái sinh tạo ra trên môi trường MS được nhân lên thành đa chồi (cụm chồi) khi chuyển sang môi trường tối ưu là MS^{1/2}, bổ sung 20g/l sucrose, kết hợp 0,4mg/l Kinetin + 1mg/l BAP + 0,2mg/l TDZ cho tỷ lệ tạo cụm chồi là 80,05%, số chồi trên cụm là 9,2 chất lượng chồi rất tốt.

Sự phát triển của chồi trên môi trường MS^{1/2}: Sự phát triển của chồi trên môi trường MS ¹/₂ với nồng độ BA (1mg/l) và αNAA (0,5mg/l), chiều cao chồi tăng rõ 8cm, có 6,5 đốt, chất lượng chồi rất tốt chồi to, khỏe phát triển nhanh tăng kích thước, lá to.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Dương Công Kiên (2003). *Nuôi cấy mô thực vật II*. NXB Đại học Quốc gia TP HCM.
- [2] Duncan D. B. (1995). *Multiple range and multiple F test*. Biometrics, 11: 1-42.
- [3] Chính phủ (2006). *Nghị định về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm*. Nghị định số 32/2006 NĐ-CP, ngày 30 tháng 03 năm 2006.
- [4] Nhut D. T, Don N. T, Vu N. H, Thien N. Q., Thuy D. T. T, Duy N. and Teixeira da Silva J.A. (2006). Advance technology in micropropagation of some important plants. In *Floriculture, ornamental and plant biotechnology*. Volume II, Teixeira da Silva J.A (Ed.). Global Science Books, UK., p. 325-335.
- [5] Nguyễn Tuấn Anh, Phan Ngọc Khoa, Trương Thị Bích Phượng (2013). Nghiên cứu nuôi cấy lớp mỏng trong nhân nhanh *in vitro* cây lan kim tuyến (*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.). Kỷ yếu Hội nghị Khoa Học Công nghệ Sinh học toàn quốc, tr. 690-694.
- [6] Phạm Hoàng Hộ (2000). *Cây cỏ Việt Nam III*. NXB Trẻ.
- [7] Nguyễn Quang Thạch và Phí Thị Cẩm Miện (2012). Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống loài lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) *in vitro* bảo tồn nguồn dược liệu quý. Tạp chí Khoa học và Phát triển, 10(4): 597-603.
- [8] Phùng Văn Phê, Nguyễn Thị Hồng Gấm, Nguyễn Trung Thành (2010). Nghiên cứu kỹ thuật nhân nhanh chồi *in vitro* loài lan kim tuyến (*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.). Tạp chí Khoa học, 26: 248-253.
- [9] Du X. M., Yoshizawa T., Tamura T., Mohri A., Sugiura M., Yoshizawa T., Irino N., Hayashi J. and Shoyama Y. (2001). Higher yielding isolation of kinsenoside in *Anoectochilus* and its antihyperliposis effect. Biol. Pharm. Bull., 24: 65-69.
- [10] Huang D. D., Law R. C. S. and Mak O. T. (1991). Effects of tissue cultured *A. formosanus* Hay. extracts on the arachidonate metabolism. Bot. Bull. Acad. Sin., 32: 113-119.
- [11] Ket N. V., Chakrabarty D., Hahn E. J. and Paek K. Y. (2003). Micropropagation of an endangered jewel orchid (*Anoectochilus formosanus*) using bioreactor system (communicated).

- [12] Ket N. V., Hahn E. J., Park S. Y., Chakrabarty D. and Paek K. Y. (2004). Micropropagation of an endangered orchid *Anoectochilus formosanus*. *Biol. Plant.*, 48(3): 339-344.
- [13] Lin J. M., Lin C. C., Chiu H.F., Yang J. J. and Lee S. G. (1993). Evaluation of the anti-inflammatory and liver protective effects of *Anoectochilus formosanus*, *Ganoderma lucidum* and *Gynostemma pentaphyllum* in rats. *Amer. J. Chin. Med.*, 21: 59-69.
- [14] Murashige, T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15, 473-497.
- [15] Mak O. T., Huang D. D. and Law R. C. S. (1990). *A. formosanus* Hay. contains substances that affect arachidonic acid metabolism. *Phyt. Res.*, 4: 45-48.
- [16] Shiau Y. J., Abhay P. S., Chen U. C., Yang S. R. and Tsay H. S. (2002). Conservation of *Anoectochilus formosanus* Hayata by artificial cross-pollination and in vitro culture of seeds. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 43: 123-130.
- [17] Teuscher H. (1978). *Erythrodes*, *Goodyera*, *Haemaria* and *Macodes*, with *Noectochilus*. *Am. Orchid Soc. Bull.*, 47: 121-129.