

ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG VÀ CHẤT ĐIỀU HÒA SINH TRƯỞNG LÊN QUÁ TRÌNH NHÂN GIỐNG *in vitro* LAN NGỌC ĐIỂM (*Rhynchostylis gigantea* L.)

Nguyễn Trường Giang, Phan Diễm Quỳnh*, Huỳnh Hữu Đức, Hà Thị Loan, Lê Thị Thu Hằng

Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Lan Ngọc điểm (*Rhynchostylis gigantea* L.) là một trong những loài phong lan bản địa quý của Việt Nam, hoa thường nở vào mùa xuân, có giá trị kinh tế cao. Trong nghiên cứu này, nhằm mục tiêu phát triển nguồn giống lan Ngọc điểm phục vụ thương mại và lưu trữ nguồn gen trong điều kiện *in vitro*, chúng tôi đã đánh giá ảnh hưởng chất điều hòa sinh trưởng, thành phần/hàm lượng khoáng đa lượng lên quá trình nhân giống *in vitro*. Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi kết hợp giữa 1 mg/16-Benzylaminopurine (BA) và 1 mg/1-Indole-3-butyric acid (IBA) thích hợp cho việc cảm ứng tạo Protocorm like bodies (PLBs) từ chồi của lan Ngọc điểm với số lượng trung bình đạt 2,22 PLBs/mẫu. Quá trình nhân nhanh chồi từ PLBs trên môi trường bổ sung 30% nước dừa giúp chồi sinh trưởng và phát triển tốt, tỷ lệ nhân chồi cao, số chồi trung bình là 4,29 chồi/mẫu, khối lượng tươi là 0,645 g/mẫu và khối lượng khô là 0,005 g/mẫu. Môi trường Vacin & Went (VW) thích hợp cho việc tái sinh cây hoàn chỉnh, thúc đẩy rễ phát triển tốt với số rễ trung bình là 3,04 rễ/cây; chiều cao cây đạt 1,51 cm; hàm lượng chlorophyll tổng đạt 588,7 µg/g. Các kết quả trên đã góp phần hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* lan Ngọc Điểm và là cơ sở tăng cường nhân nhanh cây giống *in vitro* lan Ngọc điểm đạt tiêu chuẩn chất lượng để cung cấp ra thị trường.

Từ khóa: Chất điều hòa sinh trưởng, môi trường dinh dưỡng, nhân giống *in vitro*, nước dừa, *Rhynchostylis gigantea*.

MỞ ĐẦU

Việt Nam là một trong các quốc gia có tính đa dạng sinh học cao với nhiều loài thực vật, trong đó phong lan được đánh giá là rất đa dạng và phong phú, với nhiều loài rất đẹp và có giá trị kinh tế. Tuy nhiên, hiện nay một số loài lan không được bảo tồn triệt để nên có nguy cơ bị thất thoát nguồn gen quý, trong đó phải kể đến loài lan Ngọc Điểm (*Rhynchostylis gigantea* L.). Ở Việt Nam, lan Ngọc Điểm phân bố dọc đất nước từ Bắc vào Nam, dọc theo dãy Trường Sơn đến các tỉnh Trung Bộ; Tây Nguyên; Nam Trung Bộ và Nam Bộ. Lan Ngọc điểm được trồng trên chậu nhựa, chậu đất nung,... với giá thể khô thoáng hoặc ghép trên các cây gỗ đã chết hay cây đang sinh trưởng. Ngày nay chơi lan Ngọc điểm đã được nâng lên thành nghệ thuật và nghề trồng lan cũng đã được phát triển thành ngành công nghiệp có lợi nhuận cao (Trần Hợp, 2000). Thị trường hiện nay rất đa dạng các giống lan Ngọc điểm, các đặc trưng hình thái định tính và định lượng rất khó nhận diện và phân biệt, đặc biệt là giống lan Ngọc điểm bản địa của Việt Nam. Do đó, việc cung cấp giống có nguồn gốc rõ ràng và chất lượng tốt rất được quan tâm.

Phương pháp nhân giống *in vitro* đã và đang được áp dụng thành công trên nhiều loại cây trồng khác nhau và có tầm ảnh hưởng lớn đến cả nông nghiệp và công nghiệp, thông qua việc cung cấp các cây trồng cần thiết để đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng của thế giới. Trong nhân giống *in vitro*, từ một mẫu cấy ban đầu, qua quá trình tái sinh chồi và biệt hóa mô, cơ quan có thể tạo ra một số lượng lớn các cây hoàn chỉnh, đồng nhất về chất lượng trong thời gian ngắn. Hiện nay, có một số nghiên cứu đã đánh giá ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình nhân giống *in vitro* lan Ngọc điểm. Li và đồng tác giả (2009), đã cho thấy môi trường MS bổ sung 100 g/L chuối thích hợp cho quá trình tạo cây hoàn chỉnh với chiều dài lá 1-3 cm, chiều dài rễ 0,5 – 2 cm sau 80 ngày nuôi cấy. Cây có tỷ lệ sống đạt 95% khi chuyển ra vườn ươm. Distabanjong và đồng tác giả (2010), cho thấy tỷ lệ nảy mầm đạt cao nhất của *Rhynchostylis* thu được trên môi trường Vacin and Went (VW), có bổ sung 150 ml/l nước dừa và 100g/L dịch chiết khoai tây. Naing và đồng tác giả (2010), cho thấy môi trường chứa 0,1 mg/L BA và 1 g/L activated carbon (AC) thích hợp cho quá trình tạo cây hoàn chỉnh. Đã có nhiều nghiên cứu thành công trong việc nhân giống lan Ngọc điểm bằng phương pháp nhân giống *in vitro* nhưng tập trung trên giống thương mại và mỗi nghiên cứu khác nhau đều cho thấy nồng độ chất điều hòa sinh trưởng lên từng giai đoạn nhân giống là khác nhau, điều này do đặc điểm truyền của nguồn mẫu có sự khác nhau ảnh hưởng đến khả năng nhân giống. Các nghiên cứu đa số sử dụng nguồn mẫu nghiên cứu là hạt lan, trong nghiên cứu này chúng tôi tạo nguồn mẫu *in vitro* trực tiếp từ cây mẹ được thu thập. Đối với các giống lan Ngọc điểm tự nhiên còn mang các đặc tính di truyền nội sinh lớn, khó tái sinh thì việc áp dụng phương pháp nhân giống này còn một số hạn chế nhất định như tỷ lệ tái sinh chồi, hệ số nhân chồi thấp, do đó khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng, thành phần môi trường/hàm lượng khoáng đa lượng lên quá trình tạo PLBs từ chồi, tái sinh và nhân nhanh chồi từ PLBs, tạo cây hoàn chỉnh trên giống lan Ngọc điểm (*Rhynchostylis gigantea* L.) là cần thiết. Đồng thời đây là

nguồn gen bản địa nên ngoài việc lưu trữ ở điều kiện *ex vitro* thì việc lưu trữ trong điều kiện *in vitro* cần phải thực hiện và nhân giống trong điều kiện *in vitro* nhằm phục vụ công tác bảo tồn, lai tạo giống.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Lan Ngọc điểm (*Rhynchostylis gigantea* L.) thu thập tại Vườn Quốc gia Yok Đôn (Đắk Lắk) được sử dụng để tạo nguồn mẫu *in vitro*. Chồi *in vitro* có kích thước đồng nhất, có 2-3 lá được sử dụng để thực hiện thí nghiệm.

Phương pháp nghiên cứu

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình cảm ứng tạo PLBs

Dựa trên các nghiên cứu tương tự của nhóm nghiên cứu chúng tôi trên các đối tượng lan khác, trong nghiên cứu này chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng IBA và NAA lên quá trình cảm ứng tạo PLBs trên lan Ngọc điểm. Chồi *in vitro* có từ 2-3 lá được sử dụng để khảo sát ảnh hưởng chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình cảm ứng tạo Protocorm like bodies (PLBs). Chồi *in vitro* được cắt bỏ lá, cắt mẫu có kích thước từ 0,5 – 1 cm (tính từ gốc lên), hủy đỉnh và tạo vết thương ở gốc, cấy lên môi trường Murashige and Skoog (MS) cơ bản bổ sung 30 g/L sucrose; 0,5 g/L peptone; 0,1 g/L inositol; 7 g/L agar; 0,5 – 2 mg/L BA; 0,5 – 1 mg/L IBA; 0,5 – 1 mg/L 1-Naphthaleneacetic acid (NAA); 10% nước dừa, pH 5,5. Thí nghiệm gồm 12 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại mỗi lần lặp lại 3 chai, mỗi chai 5 mẫu.

Ảnh hưởng của nước dừa lên quá trình tái sinh chồi và nhân nhanh chồi

Dựa trên môi trường thích hợp cho quá trình tái sinh chồi và nhân nhanh chồi lan Ngọc điểm từ nghiên cứu của nhóm chúng tôi được sử dụng làm môi trường nền để khảo sát ảnh hưởng của nước dừa lên quá trình tái sinh chồi và nhân nhanh chồi lan Ngọc điểm. Cụm PLBs có kích thước 0,5 – 1 cm được sử dụng để khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng kết hợp nước dừa lên quá trình tái sinh chồi và nhân nhanh chồi. Các cụm PLBs được cấy trên môi trường MS cơ bản bổ sung 30 g/L sucrose; 0,5 g/L peptone; 0,1 g/L inositol; 7 g/L agar; 0,5 mg/L BA; 10 – 40% nước dừa, pH 5,5. Thí nghiệm gồm 6 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại mỗi lần lặp lại 3 chai, mỗi chai 5 mẫu.

Ảnh hưởng của thành phần/hàm lượng khoáng đa lượng lên quá trình tạo cây hoàn chỉnh

Chồi đơn *in vitro* có từ 2-3 lá được sử dụng để khảo sát ảnh hưởng của thành phần/hàm lượng khoáng đa lượng (MS, ½ MS, ¼ MS, Knudson C (KC), VW, Gamborg B5 (B5)) lên quá trình tạo cây hoàn chỉnh. Chồi được loại bỏ phần rễ và cấy trên các môi trường có thành phần/hàm lượng khoáng đa lượng khác nhau. Xác định hàm lượng chlorophyll theo phương pháp xác định của Arnon (Arnon, 1949). Cân 25 mg mẫu, cắt nhỏ mẫu cho vào ống nghiệm chứa 10 mL acetone 80%, đậy kín và đặt trong tối ở nhiệt độ phòng trong 72 giờ. Sau 72 giờ, tiến hành đo mật độ quang của các mẫu với bước sóng 645 nm và 663 nm bằng máy đo quang phổ. Mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 3 mẫu.

Điều kiện nuôi cấy và chỉ tiêu theo dõi

Điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ngày; cường độ chiếu sáng đối với thí nghiệm tạo PLBs và nhân chồi là $50 \pm 2 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$, đối với thí nghiệm tạo cây hoàn chỉnh là $25 \pm 2 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$. Thời gian nuôi cấy 8 tuần.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo PLBs, PLBs/mẫu, số chồi/mẫu, số lá, số rễ, khối lượng tươi, khối lượng khô, hàm lượng chlorophyll.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình cảm ứng tạo PLBs

Nồng độ chất điều hòa sinh trưởng, tỷ lệ auxin và cytokinin ảnh hưởng đến quá trình cảm ứng tạo PLBs. Trong đó, NAA là một loại auxin có tác dụng kích thích sự phân bào và sinh trưởng của mô sẹo hay PLBs. BA là một loại cytokinin được dùng phổ biến trong việc kích thích phân hóa chồi ở nhiều loài thực vật (Schaller *et al.*, 2015). Trong nghiên cứu này, BA và NAA được kết hợp sử dụng ở các nồng độ khác nhau để khảo sát khả năng cảm ứng tạo PLBs từ chồi lan Ngọc điểm.

Bảng 1. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình cảm ứng tạo PLBs

NT	BA (mg/l)	NAA (mg/l)	IBA (mg/l)	Tỷ lệ tạo PLBs (%)	PLBs (PLBs/mẫu)	Chồi (Chồi/mẫu)
NT 0	-	-	-	0,00	0,00 ^e	0,00 ^f
NT 1	0,5	0,5	-	46,67	1,00 ^{cd}	1,11 ^{de}
NT 2	0,5	1	-	44,44	1,00 ^{cd}	0,89 ^{de}

CÔNG NGHỆ TẾ BÀO

NT 3	0,5	-	0,5	64,44	1,11 ^{cd}	1,33 ^{cd}
NT 4	0,5	-	1	66,67	0,00 ^e	1,89 ^b
NT 5	1	0,5	-	42,22	0,00 ^e	1,22 ^{cde}
NT 6	1	1	-	51,11	1,22 ^c	1,33 ^{cd}
NT 7	1	-	0,5	64,44	1,11 ^{cd}	1,67 ^{bc}
NT 8	1	-	1	73,33	2,22^a	2,89^a
NT 9	2	0,5	-	53,33	0,89 ^d	1,11 ^{de}
NT 10	2	1	-	42,22	1,67 ^b	0,78 ^e
NT 11	2	-	0,5	95,56	1,78 ^b	3,33 ^a
NT 12	2	-	1	73,33	1,89 ^b	3,11 ^a
CV%					29,34	29,22
BA+NAA+IBA					***	***

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê; ***: Khác biệt về mặt thống kê ở mức $P < 0,01$.

Sau 3 tuần nuôi cấy, các mẫu chưa có thay đổi nhiều về mặt hình thái. Từ tuần thứ 4, đa số các mẫu có sự thay đổi về hình thái như phình to ở gốc và một số mẫu hình thành rễ ở nghiệm thức đối chứng (NT 0). Từ tuần thứ 5, ở vị trí tăng sinh ở phần gốc của các mẫu có hiện tượng cảm ứng tạo PLBs, một số mẫu bắt đầu hình thành chồi ở gốc, một số mẫu có phần gốc hóa nâu, có sự tăng trưởng về chiều dài lá của lá đã cắt. Ở tuần thứ 8, các mẫu trong nghiệm thức đối chứng (NT 0) hình thành và phát triển rễ. Mẫu ở các nghiệm thức còn lại có sự hình thành PLBs và chồi ở phần gốc và vị trí tạo vết thương



Hình 1. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng (BA, IBA, NAA) lên quá trình cảm ứng tạo PLBs với các nồng độ khác nhau khác nhau sau 8 tuần nuôi cấy

Kết quả nghiên cứu trên cho thấy, khi kết hợp giữa IBA và BA thích hợp cho việc cảm ứng tạo PLBs từ chồi lan Ngọc điểm tốt hơn so với việc kết hợp giữa NAA và BA. Ở nghiệm thức 8 (môi trường bổ sung 1 mg/L IBA và 1 mg/L BA) cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo chồi là 73,33% và 2,22 PLBs/mẫu, PLBs có màu xanh và một số PLBs bắt đầu hình thành chồi. Theo Li và đồng tác giả (2009), kết hợp 2 mg/L BA và 1 mg/L NAA thích hợp cho quá trình cảm ứng tạo PLBs với tỷ lệ 75% trên *Rhynchosyllis gigantea* (Lindl). Một số nghiên cứu ảnh hưởng của BA và NAA lên quá trình nhân chồi từ PLBs khác cũng cho thấy có sự cảm ứng tạo chồi cao. Các kết quả nghiên cứu này cho thấy, nồng độ và tỷ lệ các chất điều hòa sinh trưởng thực vật cytokinin và auxin sử dụng khác nhau và hiệu quả trên từng đối tượng cụ thể. Trong nghiên cứu này cho thấy việc cảm ứng tạo PLBs từ chồi với tỷ lệ thấp, nhưng khả năng nhân nhanh PLBs từ PLBs cao khi kết hợp giữa NAA và BA. Điều này, do một số cây có bản chất di truyền nội sinh cao thì việc sử dụng các chất kích thích sinh trưởng nhằm tác động lên quá trình phân biệt hóa và biệt hóa các mô cây là khác nhau.

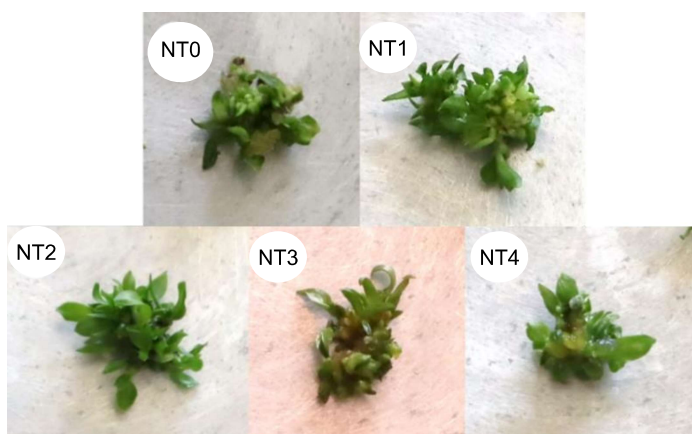
Ảnh hưởng của nước dừa lên quá trình tái sinh chồi và nhân nhanh chồi

Ngoài ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình tạo cây hoàn chỉnh thì chất hữu cơ khác cũng ảnh hưởng lên quá trình tạo cây trong nhân giống *in vitro*. Nước dừa chứa một số chất điều hòa sinh trưởng và thành phần khác như acid amin, acid hữu cơ, đường sucrose, glucose, galactose, fructose,... các hợp chất có hoạt tính auxin và cytokinin dạng glycoside (Brunet và Ibrahim, 1973). Trong nghiên cứu này đánh giá ảnh hưởng của nước dừa lên quá trình tái sinh chồi và nhân nhanh chồi lan Ngọc điểm, kết quả thu được sau 8 tuần như sau:

Bảng 2. Ảnh hưởng nước dừa lên quá trình tái sinh chồi và nhân nhanh chồi từ PLBs của lan Ngọc điểm

NT	Nước dừa (%)	Chồi trung bình (chồi/mẫu)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Mẫu chết (%)	Khối lượng tươi (g/mẫu)	Khối lượng khô (g/mẫu)
NT 0	0	3,04 ^c	82	9	0,584	0,049
NT 1	10	4,62 ^a	82	18	0,370	0,033
NT 2	20	4,04 ^{ab}	80	16	0,417	0,034
NT 3	30	4,29 ^{ab}	91	13	0,645	0,050
NT 4	40	3,78 ^b	76	7	0,552	0,046
CV%		15,19				
Nước dừa		***				

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê; ***: Khác biệt về mặt thống kê ở mức $P < 0,01$.



Hình 2. Các cụm PLBs tái sinh chồi sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường bổ sung nước dừa với các nồng độ khác nhau

Kết quả trên cho thấy khi tăng nồng độ nước dừa từ thấp đến cao thì khả năng tái sinh chồi từ PLBs tăng theo. Tuy nhiên, khi nồng độ nước dừa tăng quá cao sẽ làm giảm khả năng tái sinh chồi. Ở nghiệm thức không bổ sung nước dừa (NT 0) và bổ sung nước dừa 40% (NT 4) cho số chồi trung bình đạt thấp nhất tương ứng 3,04 và 3,78 chồi/mẫu. Nghiên cứu của Vũ Quốc Luận và đồng tác giả (2014), trên chồi lan Vân Hải *Paphiopedilum callosum* cũng ghi nhận khi tăng hàm lượng nước dừa trên 30% thì quá trình sinh trưởng của chồi có xu hướng giảm dần. Nước dừa có chứa khá nhiều hợp chất nitrogen dạng khử như các acid amin, ngoài ra nước dừa còn chứa các hormone sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin. Trong nước dừa có chứa thành phần chất điều hòa sinh trưởng nên đã làm thay đổi nồng độ cytokinin trong môi trường nuôi cấy thể hiện ở nghiệm thức bổ sung 30% nước dừa (NT 3) đã kích thích quá trình tái sinh chồi từ PLBs giúp chồi sinh trưởng và phát triển tốt với số chồi trung bình là 4,29 chồi/mẫu, tỷ lệ mẫu chết 13%, khối lượng tươi là 0,645 g/mẫu và khối lượng khô là 0,005 g/mẫu, chứng tỏ môi trường bổ sung nước dừa 30% thích hợp cho quá trình tái sinh chồi từ PLBs của lan Ngọc điểm.

Khảo sát ảnh hưởng của thành phần/hàm lượng khoáng đa lượng lên quá trình tạo cây hoàn chỉnh

Một số nghiên cứu cho thấy ngoài việc ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình tạo cây hoàn chỉnh thì thành phần/hàm lượng khoáng đa lượng cũng ảnh hưởng đến quá trình tạo cây *in vitro* như về sự hình thành rễ, chất lượng cây, hàm lượng chất khô trên một số đối tượng cây trồng (Gülser *et al.*, 2019). Nghiên cứu này cho thấy các loại môi trường khác nhau, hàm lượng khoáng đa lượng trong một loại môi trường cũng đã ảnh hưởng đến quá trình tạo cây hoàn chỉnh lan Ngọc điểm.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thành phần/hàm lượng khoáng đa lượng lên quá trình tạo cây hoàn chỉnh lan Ngọc điểm

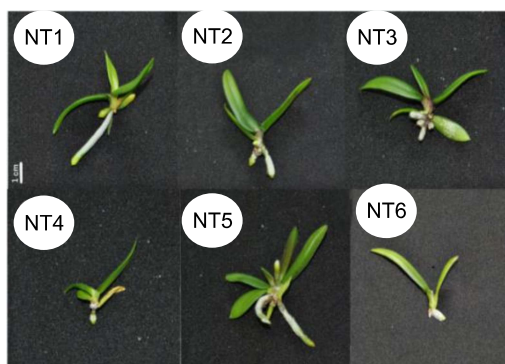
Nghiệm thức	Môi trường	Số lá trung bình	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)	Số rễ trung bình	Chiều cao (cm)	Khối lượng tươi (g/mẫu)	Khối lượng khô (g/mẫu)	Hàm lượng chlorophyll tổng (µg/g)	Tỷ lệ chlorophyll a/b
NT 1	MS	3,11 ^b	93	1,89 ^b	1,09 ^b	0,656	0,041	663,0	2,15
NT 2	MS1/2	3,47 ^b	91	1,82 ^b	1,02 ^{bc}	0,366	0,029	482,1	2,97
NT 3	MS1/4	4,16 ^a	89	2,13 ^b	1,13 ^b	0,433	0,031	524,2	2,44

CÔNG NGHỆ TẾ BÀO

NT 4	KC	3,44 ^b	44	0,60 ^d	0,82 ^{cd}	0,335	0,022	511,4	2,20
NT 5	VW	4,00^a	100	3,04^a	1,51^a	0,544	0,045	588,7	2,45
NT 6	B5	3,38 ^b	80	1,16 ^c	0,68 ^d	0,350	0,031	380,7	2,42
CV%		13,58	93	22,79	21,55				
Môi trường		***		***	***				

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ***: Khác biệt về mặt thống kê ở mức $P < 0,01$.

Sau 8 tuần nuôi cấy, tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ trên các môi trường khác nhau lần lượt là VW (100%), MS (93%), ½ MS (91%), ¼ MS (89%) và B5 (80%). Nghiệm thức sử dụng môi trường KC cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ chỉ đạt 44%, rễ và cây phát triển chậm. Nghiệm thức sử dụng môi trường VW cho kết quả tốt nhất với tỷ lệ mẫu tạo rễ, số lá mới hình thành, số rễ và chiều cao cây tương ứng 100%; 4 lá/cây; 3,04 rễ/cây; 1,51 cm/cây; rễ phát triển tốt, cây tăng trưởng nhanh, đường kính rễ lớn, lá màu xanh sáng; hàm lượng chlorophyll tổng đạt 588,7 µg/g. Nghiệm thức sử dụng môi trường MS cho thấy, sau 7 tuần nuôi cấy một số mẫu chuyển vàng, một số mẫu chết ở phần ngọn. Đối với nghiệm thức sử dụng môi trường MS1/2 mẫu cảm ứng tạo rễ kém nhất với rễ ngắn, đường kính rễ nhỏ, lá xanh nhạt, cây phát triển chậm. Ở hai loại môi trường KC và B5 không thích hợp cho sự sinh trưởng của cây thể hiện qua sự tăng trưởng chậm về chiều cao, rễ kém phát triển, một số lá ngả vàng và mẫu chết dần.



Hình 3. Mẫu cây lan Ngọc Điểm *in vitro* trên các môi trường khác nhau sau 8 tuần

Kết quả nghiên cứu trên cho thấy môi trường VW và MS1/4 thích hợp cho quá trình tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh cho lan Ngọc điểm. Tuy nhiên, khi nuôi cấy trên môi trường VW cây sinh trưởng và phát triển tốt hơn so với môi trường MS1/4. Đặc biệt, hàm lượng khoáng đa lượng ở hai môi trường này thấp hơn so với các môi trường khác đã sử dụng trong nghiên cứu. Thành phần/hàm lượng khoáng đa lượng đã ảnh hưởng đến việc tạo cây *in vitro* lan Ngọc điểm. Hàm lượng nitrogen cao ảnh hưởng đến sự phát triển của rễ, lá bị vàng sau thời gian nuôi cấy. Theo nghiên cứu của Dương Công Kiên (2006), việc sử dụng khoáng ở giai đoạn tạo cây cần nồng độ thấp sẽ thích hợp cho một số giống cây. Nghiên cứu của Kaewkhiew và đồng tác giả (2010) cho thấy môi trường VW thích hợp cho việc tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh trên lan Ngọc điểm với số lá là 4,07 lá/cây; số rễ là 3,9 rễ/cây; khối lượng tươi 1,73 g/mẫu (Kaewkhiew và Kaewduangta, 2010). Một số kết quả nghiên cứu trước đây có sự cao hơn ở một số chỉ tiêu như khối lượng khô, số rễ trung bình, chiều cao cây; nhưng cao hơn không đáng kể. Điều này cho thấy nguồn gốc mẫu, đặc điểm di truyền ảnh hưởng đến khả năng nhân giống *in vitro*. Nguồn mẫu sử dụng nuôi cấy ảnh hưởng đến sự phát triển chồi, cây trong nhân giống *in vitro* do có sự ảnh hưởng của phytohormone nội sinh, hàm lượng đường và trạng thái của biểu sinh. Từ kết quả trên, cho thấy môi trường VW thích hợp nhất để tạo cây hoàn chỉnh *in vitro* trên lan Ngọc điểm.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được nồng độ và tỷ lệ chất điều hòa sinh trưởng thích hợp cho việc cảm ứng tạo PLBs từ chồi lan Ngọc điểm có nguồn gốc từ thu thập tại Vườn Quốc Gia Yok Đôn (Đắk Lắk) là 1 mg/l BA, 1 mg/l IBA và 10% nước dừa. Hàm lượng 30% nước dừa và 0,5 mg/l BA thích hợp cho quá trình tái sinh chồi từ PLBs. Môi trường VW thích hợp cho việc tái sinh cây hoàn chỉnh với số rễ trung bình là 3,04 rễ/cây

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ trang thiết bị và cơ sở vật chất để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arnon DI (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiol*, 24: 1.
- Baker A, Kaviani B, Nematzadeh G, Negahdar N (2014). Micropropagation of Orchis catasetum—a rare and endangered orchid. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, 13: 197-205.
- Brunet G, Ibrahim R (1973). Tissue culture of Citrus peel and its potential for flavonoid synthesis. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 69: 152-162.
- Debergh P, Aitken-Christie J, Cohen D, Grout B, Von Arnold S, Zimmerman R, Ziv M (1992). Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 30: 135-140.
- Distabanjong K, Distabanjong C, Ruengwiset B (2010). *In vitro* propagation and conservation of *Rhynchostylis gigantea* (Lindl.) Ridl.
- Gülser F, Çiğ A, Gökkaya TH, Atmaca H (2019). Effects of different growing media on plant growth and nutrient contents of petunia (*Petunia hybrida*). *International Journal of Secondary Metabolite*, 6: 302-309.
- Kaewkhiew P, Kaewduangta W (2010). Natural additives modification medium: growth of *Rhynchostylis gigantea* by tissue culture technique. *Asian J Plant Sci*, 9: 498-501.
- Dương Công Kiên, 2003. Nuôi cấy mô thực vật II. Đại học quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.
- Li Z-Y, Xu L (2009). *In vitro* propagation of white-flower mutant of *Rhynchostylis gigantea* (Lindl.) Ridl. through immature seed-derived protocorm-like bodies. *Journal of Horticulture and Forestry*, 1: 093-097.
- Vũ Quốc Luận, Trịnh Thị Hương, Nguyễn Phúc Huy, Đỗ Khắc Thịnh, Dương Tấn Nhựt (2014). Ảnh hưởng của các chất bổ sung hữu cơ lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Vân hải (*Paphiopedilum callosum*) nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 52: 51-64.
- Naing AH, Park IS, Hwang YJ, Chung JD, Lim KB (2010). *In vitro* Micropropagation and Conservation of *Rhynchostylis retusa* BL. *Horticulture environment and biotechnology*, 51: 440-444.
- Schaller GE, Bishopp A, Kieber JJ (2015). The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. *Plant Cell*, 27: 44-63.
- Trần Hợp (2000). Phong Lan Việt Nam. NXB Văn hóa – Dân tộc.

EVALUATION OF THE EFFECTS OF NUTRIENT MEDIUMS AND PLANT GROWTH REGULATORS ON *IN VITRO* PROPAGATION OF *Rhynchostylis gigantea* L.

Nguyen Truong Giang, Phan Diem Quynh*, Huynh Huu Duc, Hà Thị Loan, Le Thị Thu Hang

Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

SUMMARY

Rhynchostylis gigantea L. is one of Vietnam's precious native orchids. Its flowers usually bloom in the spring, and it has high economic value. In this study, with the goal of developing *Rhynchostylis gigantea* for commercial purposes and *in vitro* conservation, we evaluated the effects of plants growth regulators and macromineral composition/content on the *in vitro* propagation protocol. The results of the study showed that the combination of BA 1 mg/L and IBA 1 mg/L was suitable to produce PLBs from buds of *Rhynchostylis gigantea* with an average amount of 2.22 PLBs/sample. The rapid multiplication of the shoots from PLBs on a medium supplemented with 30% coconut water helps shoots grow and develop well. Besides that, the shoot multiplication rate was high, and the average number of shoots, fresh weight, and dry weight were 4.29 shoots/sample, 0.645 g/sample, and 0.005 g/sample respectively. Vacin & Went medium was appropriate for complete plant regeneration and good root development with an average number of roots (3.04 roots/plant) and plantlet height (1.51 cm). Additionally, the total chlorophyll content was 588.7 µg/g. The above results have contributed to improving the *in vitro* propagation protocol as well as was fundamental to quickly multiplying *in vitro* *Rhynchostylis gigantea* to meet the quality standards of the plantlets for commercial market.

Keywords: Coconut water, *in vitro* propagation, nutrient mediums, plants growth regulators, *Rhynchostylis gigantea*.

* Author for correspondence: Tel: +84 919 003 300; Email: pdquynh.snn@tphcm.gov.vn