

NGHIÊN CỨU TẠO HẠT GIỐNG NHÂN TẠO LAN HẠC VỸ (*Dendrobium aphyllum*)

Nguyễn Thị Lại¹, Phạm Hương Sơn¹

TÓM TẮT

Lan Hạc vĩ (*Dendrobium aphyllum*) là một loài lan rừng đẹp của Việt Nam, có giá trị y học và thương mại cao. Hiện nay, loài lan này đang đứng trước nguy cơ tuyệt chủng do nạn khai thác bừa bãi và buôn bán trái phép ra nước ngoài. Phương pháp vi nhân giống cũng gặp phải một số khó khăn như chi phí sản xuất cao, thời gian bảo quản ngắn, chiếm nhiều diện tích và dễ tổn thương trong quá trình vận chuyển. Sản xuất hạt giống nhân tạo được coi là một giải pháp có hiệu quả đối với việc nhân và bảo quản loài lan này. Trong nghiên cứu, nguyên liệu dùng để tạo hạt nhân tạo là các *protocorm-like body* (PLBs) của cây *D. aphyllum in vitro*. Kết quả cho thấy nồng độ 3% sodium alginate tiếp xúc với dung dịch $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mM trong thời gian 30 phút là phù hợp nhất, hạt chắc, tròn, có kích thước đồng đều. Nội nhũ nhân tạo được làm giàu trong môi trường MS + 2,0 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA + 20 g/l sucrose + 0,1% AC + 20 mg/l ABA + 3.000 mg/l carbendazim cho tỷ lệ hạt nhân tạo nảy mầm cao và đạt cao nhất khi được bảo quản ở 4°C trong điều kiện tối.

Từ khóa: Lan rừng, hạt nhân tạo, carbendazim, bảo quản, nảy mầm

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan Hạc vĩ (*Dendrobium aphyllum*) là một cây thuốc quý hiếm thuộc họ lan (Orchidaceae), là loài lan rừng của Việt Nam có giá trị thẩm mỹ và giá trị thương mại cao. Lan Hạc vĩ thường phân bố ở một số vùng như Lâm Đồng, Khánh Hòa,...

Theo y học cổ truyền Trung Quốc, lan *D. aphyllum* có tác dụng chữa các bệnh như: trị ho, đau họng, bỏng lửa; toàn cây trị kinh phong trẻ em, ăn uống bị ngộ độc.

Do nhu cầu sử dụng làm cây hoa cảnh và dược liệu tăng mạnh trong thời gian gần đây nên loài *D. aphyllum* đã bị khai thác kiệt quệ. Mặt khác, tỷ lệ nảy mầm từ hạt trong tự nhiên rất thấp và vùng phân bố của *D. aphyllum* bị tàn phá nghiêm trọng nên loài cây này lâm vào tình trạng gần như tuyệt chủng và được đưa vào Sách Đỏ Việt Nam (phần II- Thực vật, 2007) cần phải được bảo vệ. Do vậy cần có các biện pháp kỹ thuật để nhân giống, bảo tồn và phát triển loài lan dược liệu có giá trị này của Việt Nam.

Hiện nay, trên thế giới cũng như ở Việt Nam, nhân giống lan thường thực hiện bằng kỹ thuật nuôi cấy mô cho hệ số nhân cao, số lượng cây giống lớn và đồng đều. Tuy nhiên, phương pháp vi nhân giống loài lan này đã gặp phải một số khó khăn như chi phí sản xuất cao, thời gian bảo quản ngắn, chiếm nhiều diện tích và dễ tổn thương trong quá trình vận chuyển.

Ngày nay, công nghệ sản xuất hạt giống nhân tạo đã mở ra những triển vọng mới trong công nghệ sinh học thực vật. Hạt nhân tạo không chỉ nhân nhanh với khối lượng cây lớn, giúp vận chuyển, bảo quản

dễ dàng hơn mà ngoài ra hạt nhân tạo còn được sử dụng để bảo tồn các nguồn gen quý hiếm, nguồn gen đang có nguy cơ tuyệt chủng. Hiện nay, nghiên cứu tạo hạt giống nhân tạo đã được thực hiện trên một số loài lan: *Pamabilis* (Dương Tấn Nhật và ctv., 2007), *D. nobile* Lindl. (Padmaja et al., 2013), *D. Shavin White* (Bustam et al., 2013)... Nghiên cứu này trình bày phương pháp tạo hạt giống nhân tạo loài lan (*Dendrobium aphyllum*) từ *protocorm like bodies* (PLBs), nhằm góp phần phục vụ trong công tác sản xuất giống và bảo tồn nguồn gen quý hiếm.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các cây lan *Dendrobium aphyllum* được thu thập từ Hòn Bà - Khánh Hòa và trồng trong nhà lưới, lấy chồi ngọn được khử trùng và nuôi cấy trên môi trường Vacin and Went (VW) + 20g/l sucrose + 10% CW + 1,5 mg/l BA + 7,0g/l agar, pH 5,5. Sau 6 tuần nuôi cấy các PLB (PLBs) được tạo thành, cắt PLB với kích thước 3-4 mm từ các cụm PLB để làm nguyên liệu tạo hạt nhân tạo.

2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Địa điểm nghiên cứu: Trung tâm Sinh học Thực nghiệm - Viện Ứng dụng Công nghệ - Bộ Khoa học và Công nghệ.

- Thời gian nghiên cứu: 6/2015-10/2016.

2.3. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp nghiên cứu

Phần nội nhũ nhân tạo được làm giàu bởi 20g/l sucrose, 0,1% AC, BA, IBA, carbendazim, ABA,

¹ Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ

natri benzoat, carbendazim, topsin - M, môi trường MS (không có Ca^{2+}). Bột sodium alginate ở các nồng độ khác nhau được đun cách thủy cho đến khi tan hết alginate, sau đó được hút và nhỏ giọt vào dung dịch $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Quá trình trao đổi ion giữa sodium alginate và CaCl_2 được giữ trong khoảng 10-40 phút trước khi hạt được lấy ra và rửa lại bằng nước cất vô trùng.

Các hạt nhân tạo sau khi được bảo quản ở nhiệt độ 0 - 25°C trong điều kiện tối rồi chuyển sang môi trường để khảo sát khả năng tái sinh của hạt nhân tạo.

2.3.2. Bố trí thí nghiệm

a) Ảnh hưởng của nồng độ sodium alginate (%) và $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mM) khác nhau đến khả năng tạo hạt và nảy mầm của hạt nhân tạo

Dùng pipette nhỏ từng giọt dung dịch sodium alginate với các nồng độ khác nhau (2 - 4%) chứa PLB vào dung dịch $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ có các nồng độ (75-125 mM) trong thời gian 30 phút để tạo vỏ cứng cho hạt. Sau đó các hạt được rửa lại 3 lần nước cất vô trùng. Quan sát hình dạng và độ cứng của các hạt tạo thành, chọn những hạt có kích thước đồng đều, tròn, trong, chắc để khảo sát khả năng nảy mầm của hạt khi nuôi cấy trên môi trường cơ bản VW + 20g/l sucrose + 7g/l agar + 10% CW + 0,1 % AC.

b) Ảnh hưởng của thời gian tiếp xúc với dung dịch $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ đến khả năng nảy mầm của hạt nhân tạo

Dùng pipette nhỏ từng giọt dung dịch sodium alginate nồng độ 3% chứa PLB vào dung dịch $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mM + MS, để các hạt trong dung dịch này ở thời gian khác nhau (10-40 phút) để tạo lớp vỏ hạt. Sau đó các hạt được tái sinh trên môi trường cơ bản VW + 20g/l sucrose + 7g/l agar + 10% CW.

c) Ảnh hưởng của BA, BA + IBA đến khả năng nảy mầm và sinh trưởng của hạt nhân tạo

Vỏ hạt có nồng độ 3% sodium alginate 100 mM trong 30 phút và bổ sung BA (0,0 -2,5) và 2,0 mg/l BA + (0,0 -2,5 mg/l) IBA + MS chứa PLB cho vào dung dịch $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Sau đó các hạt được nuôi cấy trên môi trường cơ bản VW + 20g/l sucrose + 7g/l agar + 10% CW.

d) Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian bảo quản đến khả năng nảy mầm và sinh trưởng của hạt nhân tạo nuôi cấy *in vitro*

Hạt nhân tạo được bảo quản trong dung dịch MS, pH 5,5. Mỗi công thức thí nghiệm đặt 10 bình, 10 hạt/ bình và để các bình ở 0, 4, 25°C trong điều kiện

tối. Sau thời gian bảo quản các hạt được nuôi cấy trên môi trường cơ bản VW + 20g/l sucrose + 7g/l agar + 10% CW.

e) Ảnh hưởng của ABA đến khả năng bảo quản hạt nhân tạo

Vỏ hạt có nồng độ 3% sodium alginate và bổ sung ABA với các nồng độ khác nhau (10-30 mg/l) + MS chứa PLB cho vào dung dịch $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mM 30 phút. Sau thời gian bảo quản các hạt được nuôi cấy trên môi trường cơ bản VW + 20g/l sucrose + 7g/l agar + 10% CW. Mỗi công thức thí nghiệm đặt 10 bình, 10 hạt/ bình. Tất cả các thí nghiệm được đặt ở 4°C trong điều kiện tối.

f) Ảnh hưởng của natri benzoat, carbendazim và topsin - M đến khả năng bảo quản hạt nhân tạo

Vỏ hạt có nồng độ 3% sodium alginate và bổ sung natri benzoat (1-4 mg/l), topsin - M (1-4 mg/l), carbendazim (1000-4000 mg/l) + MS chứa PLB cho vào dung dịch $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mM trong 30 phút. Sau thời gian bảo quản các hạt được nuôi cấy trên môi trường cơ bản VW + 20g/l sucrose + 7g/l agar + 10% CW. Mỗi công thức thí nghiệm đặt 10 bình, 10 hạt/ bình.

Các thí nghiệm được bố trí theo phương pháp khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh với 3 lần lặp lại.

2.3.3. Điều kiện nuôi cấy

Nhiệt độ phòng $25 \pm 2^\circ\text{C}$, ẩm độ 60-70%, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 1.500 - 2.300 lux.

2.3.4. Chỉ tiêu theo dõi

Tỷ lệ nảy mầm, số chồi/hạt nhân tạo, cao chồi, tỷ lệ ra rễ, số rễ/hạt nhân tạo...

2.4. Xử lý thống kê

Các số liệu thu thập được phân tích thống kê bằng phần mềm IRRISTAT 5.0 và ANOVA.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ sodium alginate (%) và $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mM) khác nhau đến khả năng tạo hạt và nảy mầm của hạt nhân tạo

Lớp vỏ nhân tạo bao bọc bên ngoài phôi sinh dưỡng được xem như nội nhũ nhân tạo, không chỉ cung cấp chất dinh dưỡng cho phôi nảy mầm mà còn bảo vệ phôi khỏi sự chấn thương cơ học trong suốt quá trình nảy mầm hay xử lý khi bảo quản. Tuy nhiên, độ cứng của lớp vỏ này đã tạo nên một môi trường kỵ khí bên trong vỏ hạt, điều này có thể ức chế quá trình hô hấp của phôi. Quá trình tạo hạt

nhân tạo với lớp bọc alginate dựa trên sự trao đổi ion Na^+ và ion Ca^{2+} để hình thành lớp vỏ chứa ion Ca^{2+} . Vì vậy, nồng độ sodium alginate cũng như thời

gian tiếp xúc để thực hiện phản ứng trao đổi giữa chúng đều có ảnh hưởng đến hình dạng, kích thước, màu sắc, độ chắc và khả năng nảy mầm của hạt.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ của dung dịch sodium alginate và $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ khác nhau đến sự hình thành vỏ hạt nhân tạo (12 tuần nuôi cấy)

Nồng độ sodium alginate (%)	Nồng độ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mM)	Đặc điểm của hạt nhân tạo
2	75	Kích thước không đồng đều, hạt dễ vỡ, quá mềm, có đuôi dài
2	100	Kích thước không đồng đều, hạt dễ vỡ, mềm, có đuôi dài
2	125	Kích thước không đồng đều, hạt dễ vỡ, mềm, có đuôi ngắn
3	75	Kích thước đồng đều, rắn, có đuôi
3	100	Trong, chắc, tròn và kích thước đồng đều
3	125	Trong, chắc, tròn và kích thước đồng đều
4	75	Kích thước đồng đều, tròn, trong mờ và khá rắn
4	100	Kích thước đồng đều, rắn, chắc, trong, tròn
4	125	Rất rắn, chắc, tròn, trong

Qua bảng 1 cho thấy: Kích thước, màu sắc và độ chắc của hạt nhân tạo phụ thuộc vào nồng độ của dung dịch sodium alginate và $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Ở nồng độ 4% sodium alginate với dung dịch $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 125 mM cho hạt rắn, chắc tuy có kích thước đồng đều. Độ rắn của hạt ảnh hưởng đến khả năng nảy mầm của hạt. Các hạt hình thành rất cứng, nên khả năng làm phá vỡ lớp vỏ bên ngoài của phôi để tiếp tục sinh trưởng bình thường, hình thành chồi và rễ cũng gặp khó khăn. Ở các nồng độ 3% sodium alginate với dung dịch $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100; 125 mM và 4% sodium alginate với dung dịch $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mM được cho là thích hợp cho việc hình thành hạt nhân tạo. Các hạt tạo từ các dung dịch này được nuôi cấy để khảo sát khả năng nảy mầm của chúng.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ của sodium alginate (%) và $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mM) khác nhau đến tỷ lệ nảy mầm của hạt nhân tạo (12 tuần nuôi cấy)

Nồng độ sodium alginate (%)	Nồng độ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mM)	Tỷ lệ nảy mầm của hạt nhân tạo (%)
3	100	95,2
3	125	65,6
4	100	50,5
4	125	33,5

Kết quả ở bảng 2 cho thấy: Việc bao bọc vỏ cho hạt nảy mầm cho thấy sự đáp ứng khác nhau của sự khởi đầu tạo chồi và rễ. Ở nồng độ dung dịch 3%

sodium alginate và dung dịch $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mM trong 30 phút khả năng nảy mầm của hạt nhân tạo đạt cao nhất (95,2%). Khi tăng nồng độ 4% sodium alginate và dung dịch $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 125mM có tỷ lệ nảy mầm của hạt đạt thấp nhất (33,5%).

3.2. Ảnh hưởng của thời gian tiếp xúc với dung dịch 100 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ đến khả năng tạo hạt, nảy mầm và khả năng sinh trưởng của hạt nhân tạo

Qua bảng 3 cho thấy: Thời gian để hạt tiếp xúc với dung dịch $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mM trong 30 phút cho kết quả tốt nhất, các hạt hình thành có kích thước đồng đều, trong, chắc, tròn và cho tỷ lệ nảy mầm cao nhất (95,5%). Khi giảm thời gian hạt tiếp xúc trong dung dịch $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mM dưới 20 phút, số lượng ion Na^+ trao đổi với ion Ca^{2+} ít, do đó các hạt hình thành mềm, dễ vỡ, kích thước không đồng đều, có hình dạng không xác định, làm giảm sự nảy mầm của hạt. Ngược lại, khi hạt tiếp xúc trong dung dịch $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mM trên 30 phút các hạt hình thành cứng nên ngăn cản sự phá vỡ lớp vỏ bên ngoài để hình thành chồi và rễ, cũng dẫn tới tỷ lệ nảy mầm của hạt giảm.

Như vậy, nồng độ 3% sodium alginate trong vỏ hạt với thời gian tiếp xúc trong dung dịch $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mM 30 phút là thích hợp nhất cho tỷ lệ hạt nảy mầm đạt cao nhất. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của (Awatef M. Badr-Elden, 2013) trên đối tượng *Strawberry*.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian tiếp xúc với dung dịch 100 mM CaCl₂. 2H₂O đến khả năng nảy mầm và khả năng sinh trưởng của hạt nhân tạo (12 tuần nuôi cấy)

Thời gian tiếp xúc với dung dịch 100 mM CaCl ₂ . 2H ₂ O (phút)	Đặc điểm của hạt tạo thành	Tỷ lệ nảy mầm của hạt nhân tạo (%)	Số chồi/hạt	Chiều dài chồi (mm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ/hạt
10	Kích thước không đồng đều, hạt dễ vỡ, mềm	42,0	1,6	6,2	14,0	2,4
20	Hạt mềm, tròn, trong	58,0	1,8	9,2	61,6	2,6
30	Kích thước đồng đều, trong, chắc, tròn	95,5	2,8	9,6	98,2	3,2
40	Rắn, tròn, đục	29,6	1,5	6,1	74,5	2,1
<i>LSD_{.05}</i>			0,7	3,4		0,4
<i>CV%</i>			2,3	3,0		2,8

3.3. Ảnh hưởng của BA, BA + IBA đến khả năng nảy mầm và sinh trưởng của hạt nhân tạo

Kết quả ở bảng 4 cho thấy khi bổ sung BA và tổ hợp BA + IBA vào dung dịch 3% sodium alginate có ảnh hưởng tích cực đến tỷ lệ nảy mầm của hạt sau 12 tuần. Tỷ lệ hạt nảy mầm đạt cao nhất khi ở

nồng độ 2,0 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA là 98%, trong khi đối chứng (không bổ sung) chỉ đạt 76,0 %. Ngoài ra, số chồi, chiều cao chồi cũng cho thấy có ảnh hưởng tốt khi ở nồng độ 2,0 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA, số chồi đạt cao nhất 8,0 chồi/ hạt, chiều cao chồi đạt 14,2 mm.

Bảng 4. Ảnh hưởng của BA, BA + IBA đến khả năng nảy mầm và sinh trưởng của hạt nhân tạo (12 tuần nuôi cấy)

Nồng độ BA (mg/l)	Nồng độ IBA (mg/l)	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Số chồi/ hạt	Chiều cao chồi (mm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ/hạt
0.0	-	76,0	2,0	9,8	42,0	2,8
0.5	-	80,0	2,5	10,2	46,0	3,2
1.0	-	83,0	3,6	11,5	51,0	3,5
1.5	-	88,0	5,2	12,3	55,0	3,6
2.0	-	92,0	6,4	12,8	70,0	3,9
2.5	-	84,0	5,1	11,8	58,0	2,8
<i>LSD_{.05}</i>			0,77	0,40		0,36
<i>CV%</i>			3,0	2,3		2,7
2.0	0.5	98,0	8,0	14,2	88,0	4,0
2.0	1.0	93,0	7,6	11,6	62,4	3,5
2.0	1.5	81,0	7,0	11,0	58,2	3,2
2.0	2.0	79,0	5,3	9,2	55,0	3,0
2.0	2.5	77,0	4,6	8,7	41,2	2,6
<i>LSD_{.05}</i>			1,20	2,29		0,14
<i>CV%</i>			2,3	3,1		2,2

3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian bảo quản đến khả năng nảy mầm và sinh trưởng của hạt nhân tạo nuôi cấy *in vitro*

Qua quá trình thí nghiệm ở các dải nhiệt độ khác nhau (0, 4, 8, 12, 16, 20, 25 °C), thì ở điều kiện nhiệt độ (0, 4, 25°C) là có ý nghĩa đối với các chỉ tiêu theo dõi, kết quả được trình bày ở bảng 5 cho thấy: Khả

năng nảy mầm của hạt đạt cao nhất khi bảo quản ở nhiệt độ 4°C (71,20%) sau 16 tuần bảo quản. Khi bảo quản ở nhiệt độ phòng 25°C, khả năng nảy mầm của hạt cũng khá cao với số chồi và tỷ lệ ra rễ là 3,88 và 56,20%. Chiều cao chồi và tỷ lệ ra rễ, số rễ của hạt cũng đạt cao nhất khi bảo quản hạt ở 4°C (4,0 mm, 70% và 3 rễ). Bảo quản hạt ở 0°C ảnh hưởng không

thuận lợi đến khả năng nảy mầm của hạt. Khả năng nảy mầm của hạt thấp nhất khi bảo quản hạt ở 0°C (12,65%), tương ứng với chiều cao chồi và số rễ là thấp hơn cả (2,2 mm và 0,66 rễ). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của (Mehpara Maqsood *et al.*, 2015) trên đối tượng loài *Caladium bicolor*.

Như vậy, trong thí nghiệm này bảo quản hạt nhân tạo ở 4°C là thích hợp hơn cả. Điều này có thể

giải thích là nhiệt độ thấp làm giảm cường độ hô hấp của hạt tuy rằng vẫn cần một lượng chất dinh dưỡng nhất định trong dung dịch để phôi hô hấp và thực hiện sự trao đổi chất. Bảo quản ở nhiệt độ phòng 25°C, tuy rằng phôi vẫn sống sót nhưng dễ bị tổn thương, phôi có khả năng nảy mầm nhưng khả năng sinh trưởng sẽ giảm.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian bảo quản đến khả năng nảy mầm và sinh trưởng của hạt nhân tạo nuôi cấy *in vitro*

Nhiệt độ bảo quản (°C)	Thời gian (tuần)	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Số chồi/ hạt	Chiều cao chồi (mm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ/hạt (cái)
0	8	70,20	3,00	5,50	40,62	1,90
	12	48,22	2,22	3,65	26,00	1,63
	16	12,65	1,52	2,20	12,10	0,66
4	8	88,02	8,60	8,63	80,20	2,60
	12	76,06	7,54	4,30	77,30	3,12
	16	71,20	6,40	4,00	70,00	3,00
25	8	66,04	5,30	7,60	80,20	2,50
	12	53,62	4,50	4,12	58,30	1,20
	16	40,53	3,88	2,67	56,20	0,75
LSD _{.05}			0,30	0,61		0,50
CV%			2,3	2,8		3,4

3.5. Ảnh hưởng của ABA đến khả năng nảy mầm và sinh trưởng của hạt nhân tạo sau thời gian bảo quản

Qua kết quả thể hiện trong bảng 6, khi thời gian bảo quản tăng thì khả năng hạt giống nảy mầm cũng giảm dần. Khi bổ sung ABA ở nồng độ 20 mg/l cho tỷ lệ nảy mầm của hạt nhân tạo đạt cao nhất trong thời bảo quản là 24 tuần lên đến 50,02%. Trong khi

đối chứng (0,0 mg/l ABA), tỷ lệ nảy mầm của hạt nhân tạo giảm xuống nhanh chóng sau 24 tuần và tỷ lệ nảy mầm của hạt giảm 12,6 %. Khi ta tăng nồng độ ABA cao hơn 20 mg/l thì tỷ lệ nảy mầm, số chồi/ hạt, chiều cao chồi, tỷ lệ ra rễ của hạt nhân tạo có xu hướng giảm, có thể do nồng độ cao ức chế sự nảy mầm của hạt nhân tạo.

Bảng 6. Ảnh hưởng của ABA đến khả năng nảy mầm và sinh trưởng của hạt nhân tạo sau thời gian bảo quản

Nồng độ ABA (mg/l)	Thời gian (tuần)	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Số chồi/ hạt	Chiều cao chồi (mm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ/hạt (cái)
0.0	8	85,20	6,30	8,20	78,60	3,00
	16	64,00	5,66	3,92	70,42	3,08
	24	12,60	4,40	3,33	36,24	1,90
10	8	87,22	6,52	8,25	78,92	3,12
	16	70,10	5,04	7,14	70,67	2,90
	24	32,65	2,52	4,20	22,10	1,62
20	8	88,50	8,36	9,26	96,63	4,20
	16	79,00	8,21	8,80	86,20	3,88
	24	50,02	8,00	8,63	80,12	2,60
30	8	48,22	2,30	4,04	50,20	2,56
	16	30,10	2,02	3,65	32,12	1,32
	24	17,80	1,80	2,30	12,00	1,10
LSD _{.05}			0,25	0,36		0,24
CV%			3,4	3,7		2,3

3.6. Ảnh hưởng của natri benzoat, topsin - M và carbendazim đến khả năng sống sót của hạt nhân tạo sau thời gian bảo quản

Nhằm nâng cao khả năng sống sót của hạt nhân tạo sau thời gian bảo một số hóa chất bảo quản đã sử dụng, kết quả được trình bày ở bảng 7.

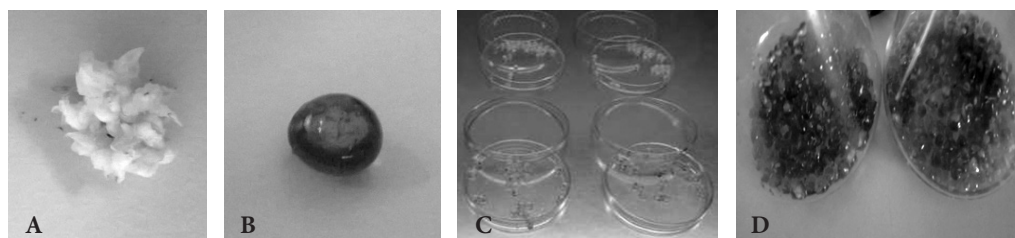
Trong 3 loại hóa chất bảo quản natri benzoat, topsin - M và carbendazim được trộn lẫn vào hỗn hợp màng nhân tạo thì carbendazim có hiệu quả cao nhất. Khi bổ sung nồng độ của carbendazim thấp

(0 - 2000 mg/l) tỷ lệ nhiễm của hạt giống nhân tạo rất cao và tỷ lệ nảy mầm đạt thấp. Ở nồng độ cao carbendazim hơn 3000 mg/l, có hiệu quả trong việc kiểm soát sự phát triển của nấm và vi khuẩn. Tỷ lệ nhiễm của hạt giống nhân tạo đã không xảy ra, nhưng lại xảy ra hiện tượng hạt nhân tạo bị hoại tử, có thể do nồng độ carbendazim cao đã gây độc cho hạt và tỷ lệ nảy mầm cũng rất thấp. Ở nồng độ 3000 mg/l carbendazim đã làm giảm tỷ lệ nhiễm và tỷ lệ nảy mầm của hạt đạt cao nhất là 70,2 % sau 24 tuần theo dõi.

Bảng 7. Ảnh hưởng của natri benzoat, topsin - M và carbendazim đến khả năng sống sót của hạt nhân tạo sau bảo quản

Chất bảo quản	Nồng độ (mg/l)	12 tuần			16 tuần			24 tuần		
		Tỷ lệ tái sinh hạt (%)	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ chết (%)	Tỷ lệ tái sinh hạt (%)	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ chết (%)	Tỷ lệ tái sinh hạt (%)	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ chết (%)
Natri benzoat	0.0	81,0	19,0	0,0	58,0	42,0	0,0	50,2	47,0	2,8
	1.0	83,1	16,9	0,0	60,3	39,7	0,0	51,0	38,6	10,4
	2.0	85,2	14,8	0,0	62,2	37,8	0,0	53,1	32,0	14,9
	3.0	86,4	13,6	0,0	66,4	33,6	0,0	56,0	31,0	13,0
	4.0	70,3	29,7	0,0	50,1	41,9	8,0	46,3	31,2	22,5
Topsin - M	0.0	82,0	18,0	0,0	57,0	43,0	0,0	51,0	37,0	12,0
	1.0	83,6	16,4	0,0	63,6	36,4	0,0	52,0	32,7	15,3
	2.0	85,3	14,7	0,0	69,3	30,7	0,0	53,6	29,8	16,6
	3.0	87,2	12,8	0,0	77,2	22,8	0,0	57,0	25,0	18,0
	4.0	71,0	19,0	10,0	66,0	12,0	22,0	43,8	19,0	37,2
Carbendazim	0.0	82,0	18,0	0,0	61,0	39,0	0,0	49,8	40,2	10,0
	1000	84,2	15,8	0,0	64,0	36,0	0,0	51,0	30,5	18,5
	2000	86,5	13,5	0,0	69,0	21,0	10,0	58,0	22,0	20,0
	3000	92,0	8,0	0,0	80,0	10,0	10,0	70,2	0,8	29,0
	4000	40,0	0,0	60,0	56,0	0,0	44,0	48,0	0,0	52,0

Một số hình ảnh tạo hạt nhân tạo lan hạc vỹ (*Dendrobium aphyllum*)



Hình 1. A: *protocorm-like body*; B, C: hạt nhân tạo; D: Hạt nhân tạo được bảo quản sau 24 tuần

IV. KẾT LUẬN

- Hạt nhân tạo, hình thành với vỏ bọc là môi trường MS bổ sung 3% sodium aiginat và tạo hạt trong dung dịch $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ trong 30 phút là phù hợp nhất, hạt chắc, tròn, đều, đạt tỷ lệ nảy mầm là 95,56% khi nuôi cây hạt trong điều kiện *in vitro*.

- Nội nhũ nhân tạo được làm giàu trong môi trường MS + 2,0 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA + 20 g/l sucrose + 0,1% AC + 20 mg/l ABA + 3.000 mg/l carbendazim cho tỷ lệ hạt nảy mầm cao nhất.

- Hạt nhân tạo có khả năng nảy mầm cao nhất đạt 70,2% khi được bảo quản ở 4°C trong điều kiện tối sau 24 tuần.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được hoàn thành với kinh phí thực hiện đề tài KH&CN (Hợp đồng số 04/ĐT/CB/2015 ngày 02/01/2015, Đề tài cấp Bộ: Nghiên cứu tạo hạt nhân tạo cây lan dược liệu của Việt Nam (*Dendrobium aphyllum*) phục vụ lưu giữ và nhân giống) và sự hỗ trợ về trang thiết bị Phòng thí nghiệm Phát triển ứng dụng Y sinh công nghệ cao - Viện Ứng dụng Công nghệ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2007. *Sách Đỏ Việt Nam, phần II- Thực vật*, NXB. KHTN&CN, Hà Nội, tr. 418 - 419.

Dương Tấn Nhật, Nguyễn Thị Kim Tuyền, Nguyễn Duy, Mai Xuân Phán, 2007. Tái sinh và bảo quản hạt nhân tạo của cây lan Hồ điệp (*Phalaenopsis amabilis*). *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 5(1): 85-95.

Awatef M. Badr-Elden, 2013. An Effective Protocol

for in vitro Storage and ex vitro Re-Growth of Strawberry Capsules. *Atlas Journal of Chemistry & Biochemistry* 1 (2): pp. 30-38.

Bustam, S., Sinniah, U.R., Kadir, Zaman F. Q. Subramaniam. S., 2013. Selection of optimal stage for protocorm-like bodies and production of artificial seeds for direct regeneration on different media and short term storage of *Dendrobium* Shavin White. *Plant Growth Regulation*. Volume 69, Issue 3: 215-224.

Mehpara Maqsood, Abdul Mujib, Mir Khusrau, 2015. Preparation and Low Temperature Short-term Storage for Synthetic Seeds of *Caladium bicolor*. *Not Sci Biol*, 2015,7(1):90-95. DOI: 10.15835/nsb.7.1.9405.

Padmaja Mohanty, Pynbeitsyon Nongklung, Meera C. Das, Suman Kumaria and Pramod Tandon, 2013. Short-term storage of alginate-encapsulated protocorm-like bodies of *Dendrobium nobile* Lindl.: an endangered medicinal orchid from North-east India. *Biotech*. 2013 Jun; 3(3): 235-239.

Study on the production of synthetic seed for *Dendrobium aphyllum*

Nguyen Thi Lai, Pham Huong Son

Abstract

Dendrobium aphyllum (Orchidaceae) is one of beautiful wild orchids of Vietnam. Besides economic value, it is used as an herb in the traditional medicine. This orchid type is going to be extincted in nature by illegal exploitation and trade. Micropropagation methods of this orchid have encountered many difficulties such as short time of plantlet preservation, high production cost and great requirement of preservation space. Synthetic seed production of *D. aphyllum* is considered as an innovative and effective solution for micropropagation and storage of this valuable species. In this study, synthetic seed were produced from protocorm-like bodies (PLBs) of *D. aphyllum*, the results indicated that 3% sodium alginate and exposure to 100 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ solution for 30 min produced firm, clear, round and uniform optimal beads which were suitable for handling. Synthetic seeds of *D. aphyllum* with artificial endosperm constituents of MS + 2,0 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA + 2% sucrose + 0,1% AC + 20 mg/l ABA + 3.000 mg/l carbendazim gave high germination percentage. Synthetic seeds which were stored in dark at 4°C showed the highest percentage of germination.

Key words: Wild orchids, synthetic seeds, carbendazim, stored storage, germination

Ngày nhận bài: 28/12/2016

Ngày phản biện: 15/01/2017

Người phản biện: TS. Nguyễn Thị Kim Lý

Ngày duyệt đăng: 24/01/2017

KẾT QUẢ BẢO TỒN NGUỒN GEN CÂY BÔNG TẠI VIỆT NAM GIAI ĐOẠN 2012 - 2016

Đặng Minh Tâm¹, Nguyễn Văn Sơn¹

TÓM TẮT

Trong 5 năm (từ 2012 - 2016), Viện Nghiên cứu Bông và Phát triển Nông nghiệp Nhà Hồ đã tiến hành thu thập và nhập nội được 167 mẫu giống bông Luồi (*Gossypium hirsutum* L.); nhân lại được 1.047 mẫu giống bông có biểu hiện suy giảm tỷ lệ nảy mầm và bảo quản an toàn nguồn gen hạt cho 2.301 mẫu hạt giống bông trong kho lạnh ngắn hạn. Đồng thời, Viện cũng tiến hành đánh giá sơ bộ, chi tiết và tư liệu hoá cho 206 mẫu giống bông/35 tính trạng và xây dựng cơ sở dữ liệu dưới dạng số lưu, tập tin M.Word, M.Excel và đĩa CD cho 206 mẫu giống bông Luồi với 35 tính trạng/mẫu giống.

Từ khóa: Thu thập, bảo tồn, tư liệu hóa, tính trạng

¹ Viện Nghiên cứu Bông và Phát triển Nông nghiệp Nhà Hồ