



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.027

## XÁC ĐỊNH SỰ ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC NGUỒN CARBON VÀ ÁNH SÁNG LÊN SỰ NHÂN MẬT SỐ PROTOCORM - LIKE BODY (PLB) CỦA LAN *Dendrobium SONIA* NUÔI CÂY *in vitro*

Hoàng Ngọc Khánh<sup>1\*</sup> và Nguyễn Thị Pha<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Nông nghiệp, Trường Cao đẳng Kinh tế - Kỹ thuật Cần Thơ

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Hoàng Ngọc Khánh (email: hnkhanh@ctec.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 21/03/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

### Title:

Identify the influence of different carbon and light sources on the regeneration of protocorm - like body (PLB) of *Dendrobium Sonia* in vitro

### Từ khóa:

*Dendrobium Sonia*, nguồn carbon, nuôi cấy mô, thể tiền chồi

### Keywords:

Carbon source, *Dendrobium Sonia*, protocorm-like bodies, tissue culture

### ABSTRACT

This research aimed to find the suitable medium supporting the regeneration of *Dendrobium Sonia* PLB based on analysis of two factors: carbon sources and light conditions. Murashige and Skoog (1962) medium with added agar 6.5 g/L and vitamins (thiamine, pyridosine with 0.5 m/L for each) were used. The research consisted of Experiment 1 with sucrose, D-glucose, D-fructose and Experiment 2 established by mixing carbon sources medium in both lab light (fluorescent white light) and natural light. The data on the percentage of newly created PLB over two months were analyzed using ANOVA and LSD (5%) method. The results revealed that the medium adding 20 mg/L sucrose under fluorescent white light was the most suitable conditions for the generation of PLB with 614,5 PLB regenerated. Experiment 2 showed that the medium mixing of 15 mg/L D-glucose and 15 mg/L D-fructose under fluorescent white light was the best medium for the generation of PLB of *Dendrobium Sonia* with 735,7 PLB after two months.

### TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu nhằm tìm môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự nhân mật số thể tiền chồi của lan *Dendrobium Sonia* dựa trên 2 nhân tố: nguồn carbon và chế độ ánh sáng. Môi trường nuôi cấy của Murashige và Skoog (1962) bổ sung agar 6,5 g/L và vitamin (thiamine, pyridosine với 0,5 m/L mỗi loại) được sử dụng. Nghiên cứu gồm: Thí nghiệm 1 với đường sucrose, D-glucose, D-fructose và Thí nghiệm 2 gồm hỗn hợp các loại đường được tiến hành trong hai chế độ ánh sáng: đèn huỳnh quang và ánh sáng tự nhiên. Thành phần phần trăm (%) PLB được tạo trong 2 tháng được phân tích ANOVA và phép so sánh cặp LSD 5%. Kết quả cho thấy môi trường có bổ sung nồng độ đường 20 mg/L sucrose và dưới chế độ ánh sáng đèn huỳnh quang có mật độ nhân PLB tốt nhất với 614,5 PLB được tạo thành. Thí nghiệm 2 cho thấy môi trường hỗn hợp 15 mg/L D-glucose và 15 mg/L D-fructose tạo điều kiện nhân mật số tốt nhất với 735,7 PLB được tạo sau 2 tháng nuôi cấy *in vitro*.

Trích dẫn: Hoàng Ngọc Khánh và Nguyễn Thị Pha, 2019. Xác định sự ảnh hưởng của các nguồn carbon và ánh sáng lên sự nhân mật số protocorm - like body (PLB) của lan *Dendrobium Sonia* nuôi cấy *in vitro*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(1): 209-215.

## 1 GIỚI THIỆU

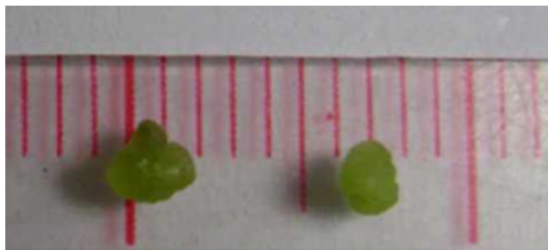
Chi lan *Dendrobium* gồm nhiều loài lan có điều kiện sống rất phù hợp với khí hậu nước ta. Hiện nay, nhu cầu về hoa lan cắt cành cũng như hoa kiểng đối với loài lan này rất lớn. Việc ứng dụng công nghệ nuôi cấy mô thực vật trong quá trình sản xuất giống lan *Dendrobium* góp phần cung cấp nguồn lan giống có giá trị kinh tế cao này. Phương pháp nhân giống vô tính từ mầm ngủ phát hoa thường được sử dụng để tạo nguồn nguyên liệu mô *in vitro* cho một số phương pháp khác như phát sinh thể tiền chồi (Protocorm-like body: PLB) từ mô *in vitro* (Nguyễn Thị Pha và *ctv.*, 2011). Trong các giai đoạn nuôi cấy mô, giai đoạn tái sinh thể tiền chồi có ưu điểm như nhân nhanh mật số mô, rút ngắn thời gian nuôi cấy, tạo nguồn giống đồng nhất về chất lượng (Restanto *et al.*, 2016). PLB có cấu trúc giống với các protocorm và được hình thành từ mẫu cây mô (explants) hoặc từ mô sẹo. (Jones and Tisserat, 1990; Chugh *et al.*, 2009, Fang *et al.*, 2016). Nuôi cấy mô thực vật thường dùng đường là sucrose và D-glucose với nồng độ khoảng 20 – 30 g/L (Dodds and Roberts, 1985). Bên cạnh, ánh sáng cũng đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát triển của mô vì ánh sáng là một trong những tín hiệu chính được thực vật tiếp nhận bởi vì nó là nguồn năng lượng cho quá trình quang hợp và các quá trình sinh hóa như sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp (Hart, 2012; Kozai, 2016; Batista *et al.*, 2018). Tuy nhiên, các nghiên cứu về quá trình nhân mật số PLB trên lan *Dendrobium* dưới tác động của chế độ ánh sáng kết hợp với việc sử dụng các nguồn carbon khác nhau vẫn còn hạn chế. Mặc dù có một vài nghiên cứu về sự ảnh hưởng của loại đường lên khả năng phát sinh, tái sinh PLB trên *Dendrobium* (Udomdee *et al.*, 2015) hay nghiên cứu sự ảnh hưởng phối hợp của màu sắc ánh sáng và chất điều hòa sinh trưởng lên sự sinh trưởng *in vitro* của lan *Dendrobium* (Ngô Thanh Phú và Nguyễn Bảo Toàn, 2014) nhưng chưa có nghiên cứu về tác động kết hợp của nguồn carbon và chế độ ánh sáng lên sự nhân mật số PLB lan *Dendrobium* Sonia. Vì vậy, nghiên cứu này khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ đường sucrose, D-glucose, D-fructose cùng chế độ ánh sáng đến sự nhân mật số PLB lan *Dendrobium* Sonia.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Nguyên vật liệu

Mẫu PLB của lan *Dendrobium* Sonia được nhân từ chồi ngủ đoạn thân cây non 1-2 tháng tuổi trên môi trường ½ MS bổ sung 1 mg/L NAA và 1 mg/BAP từ Phòng thí nghiệm Sinh học Phân tử, Trường Đại học Cần Thơ. PLB được chọn sử dụng trong thí nghiệm phải đủ lớn, có màu xanh đậm và đồng nhất được tách cẩn thận tránh gây tổn hại đến

PLB nhằm hạn chế ảnh hưởng đến sự phát triển của PLB sau khi cấy, mỗi PLB riêng lẻ đường kính trung bình khoảng 2 mm (Hình 1).



Hình 1: PLB nguồn được sử dụng trong nghiên cứu

### 2.2 Hóa chất

Môi trường nền để nuôi cấy là môi trường 1/2 MS (Murashige and Skoog, 1962) được bổ sung agar (6,5 g/L), FeNaEDTA (50 mg/L), thiamine (0,5 ml/L), pyridosine (0,5 ml/L), BA (0,1 mg/L), NAA (1 mg/L). Môi trường nền sẽ được bổ sung các nguồn carbon gồm: sucrose, D-glucose, D-fructose với nồng độ tùy theo từng thí nghiệm trong nghiên cứu.

### 2.3 Điều kiện thí nghiệm

Thí nghiệm được tiến hành trong hai chế độ ánh sáng (ánh sáng phòng thí nghiệm và ánh sáng tự nhiên). Nhiệt độ trong phòng nuôi cấy mô là 25-27°C, ánh sáng đèn huỳnh quang với cường độ 1.000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày. Nhiệt độ nhà lưới khoảng 30±2°C. Các thí nghiệm thức ánh sáng tự nhiên, các mẫu được đặt ngoài hành lang phòng thí nghiệm với nhiệt độ và ánh sáng tự nhiên.

### 2.4 Phương pháp thí nghiệm

#### 2.4.1 Chuẩn bị môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy 1/2 MS được thêm vào các vitamin, chất điều hòa sinh trưởng, các amino acid và các loại đường theo từng thí nghiệm. Sau đó tiến hành chỉnh pH khoảng 5,7-5,8 bằng dung dịch HCl 1N và KOH 1N và chia 60 ml môi trường vào mỗi chai thủy tinh (chiều cao 20 cm x đường kính 8 cm). Sau đó khử trùng trong nồi autoclave ở 121°C trong 15 phút ở áp suất 100 kPa. Môi trường lấy ra để nguội, để khoảng 4-7 ngày.

2.4.2 Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của đường sucrose, D-glucose, D-fructose và điều kiện ánh sáng đối với sự nhân mật số PLB của lan *Dendrobium* Sonia

Các PLB nguồn được chọn với đường kính trung bình 2 mm, sau đó, được cấy vào các chai thủy tinh đã được chuẩn bị từ trước. Mỗi thí nghiệm với từng loại carbon được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên 2 nhân tố: nồng độ đường (20 - 30 - 40 g/L) và chế độ ánh sáng (ánh sáng phòng thí nghiệm, ánh sáng tự nhiên). Đối chứng là môi trường nền không

bổ sung đường. Mỗi thí nghiệm có 8 nghiệm thức, 3 lần lặp lại, mỗi lần 2 keo, mỗi keo 9 PLB.

**2.4.3 Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của sự kết hợp của các loại đường và điều kiện ánh sáng đối với sự nhân mật số của PLB lan *Dendrobium Sonia***

**Bảng 1: Các nghiệm thức trong thí nghiệm 2**

Nghiệm thức	Công thức
SG	15 g/L sucrose và 15 g/L D-glucose trong điều kiện ánh sáng phòng thí nghiệm
SF	15 g/L sucrose và 15 g/L D-fructose trong điều kiện ánh sáng phòng thí nghiệm
GF	15 g/L D-glucose và 15 g/L D-fructose trong điều kiện ánh sáng phòng thí nghiệm
SG'	15 g/L sucrose và 15 g/L D-glucose trong điều kiện ánh sáng tự nhiên
SF'	15 g/L sucrose và 15 g/L D-fructose trong điều kiện ánh sáng tự nhiên
GF'	15 g/L D-glucose và 15 g/L D-fructose trong điều kiện ánh sáng tự nhiên

**2.5 Chỉ tiêu theo dõi trong các thí nghiệm**

Các thí nghiệm được tiến hành đồng loạt và lấy chỉ tiêu ở 4 tuần, 6 tuần, 8 tuần sau khi cấy. Số liệu được thu thập bằng cách đếm số PLB tạo thành từ một PLB được cấy ban đầu và màu sắc PLB trong từng chai nuôi cấy sẽ được ghi nhận. Mỗi chai gồm 9 PLB được cấy cách khoảng đều nhau.

Cách thực hiện thí nghiệm 2 giống với thí nghiệm 1 nhưng nguồn carbon được sử dụng là hỗn hợp gồm hai loại đường với nồng độ 15 g/L từng loại và được bố trí cụ thể như Bảng 1.

**2.6 Xử lý số liệu**

Các số liệu được phân tích ANOVA và phép so sánh cặp LSD 5% của phần mềm MSTATC.

**3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1 Thí nghiệm 1. Ảnh hưởng của từng loại carbon và chế độ ánh sáng lên sự nhân mật số PLB**

– Chỉ tiêu về quá trình nhân mật số của PLB

**Bảng 2: Ảnh hưởng nồng độ đường sucrose và chế độ ánh sáng lên quá trình nhân PLB**

Nghiệm thức	Nồng độ đường (g/L)	Chế độ ánh sáng	PLB được tạo thành		
			4 tuần	6 tuần	8 tuần
S1	20	PTN	202,83 <sup>a</sup>	524,33 <sup>a</sup>	614,5 <sup>a</sup>
S1'	20	TN	54 <sup>c</sup>	202,83 <sup>b</sup>	44,33 <sup>c</sup>
S2	30	PTN	123,83 <sup>b</sup>	426,67 <sup>a</sup>	510,67 <sup>a</sup>
S2'	30	TN	33,5 <sup>c</sup>	29,17 <sup>c</sup>	23,67 <sup>c</sup>
S3	40	PTN	54 <sup>c</sup>	173,33 <sup>b</sup>	219,33 <sup>b</sup>
S3'	40	TN	43,17 <sup>c</sup>	78,67 <sup>bc</sup>	82,67 <sup>c</sup>
ĐC	0	PTN	45,17 <sup>c</sup>	78 <sup>bc</sup>	116,33 <sup>bc</sup>
ĐC'	0	TN	19,33 <sup>c</sup>	35,67 <sup>c</sup>	33,5 <sup>c</sup>
A (đường)			**	**	**
B (ánh sáng)			**	ns	ns
A x B			**	ns	ns

Các nghiệm thức có cùng mẫu tự không khác biệt nhau theo phân hạng LSD-Test.

Ký hiệu: ns, \*\*, \*: không khác biệt hoặc khác biệt ở mức  $p < 0,01$  và  $0,05$  theo xử lý ANOVA hai nhân tố.

PTN: phòng thí nghiệm, TN: tự nhiên

**Đối với môi trường bổ sung sucrose:** Bảng 2 cho thấy số lượng PLB tăng cao ở các nghiệm thức S1 (20 g/L sucrose), S2 (30 g/L sucrose) và S3 (40 g/L sucrose). Trong đó, nghiệm thức sử dụng nồng độ 20 mg/L có PLB nhân mật số tốt nhất ở tất cả thời điểm lấy chỉ tiêu 4, 6 và 8 tuần (202,83; 524,33 và 614,5 PLB). Bên cạnh đó, chế độ ánh sáng tự nhiên không thích hợp với quá trình nhân mật số của PLB, ở các nghiệm thức bố trí tại nhà lưới, có sự giảm mật số sau 6 tuần nuôi cấy, số PLB bị chết đi nhiều nhất ở nghiệm thức S1'. Kết quả trên phù hợp với nghiên

cứu của Kock (1996) đã báo cáo rằng đường ảnh hưởng đến hệ thống cảm biến đường bắt đầu thay đổi biểu hiện gen cho quá trình quang hợp, huy động dự trữ và quá trình tổng hợp trong thực vật. Ngoài ra, sự biểu hiện của một số gen liên quan đến sự hình thành lục lạp đã được báo cáo là giảm khi thực vật tiếp xúc với môi trường có hàm lượng đường cao (Bauer *et al.*, 2001). Trong số 6 loại nguồn carbon được dùng trong thí nghiệm, Udomdee *et al.* (2015) cho rằng sucrose, glucose, fructose và maltose tốt hơn sorbitol và mannitol để tăng mật số PLB. Nồng

độ sucrose từ 10,6 g -16,2 g/L là tốt hơn so với nồng độ khác được khảo sát để nhân mật số PLB. Theo báo cáo của Tokuhara and Mii (2003) nồng độ tốt nhất cho sự hình thành PLB của mô lan *Phalaenopsis* Snow Parade là 5,3 g/L. Uddain (2015) báo cáo rằng quá trình nhân mật số PLB đạt hiệu suất cao nhất với môi trường 1/2 MS bổ sung 20 g/L sucrose. Như vậy, việc bổ sung nồng độ thấp đường sucrose sẽ tạo môi trường nhân mật số PLB hiệu quả nhất. Nồng độ sucrose càng cao thì càng ức chế sự phát triển của mô trong nuôi cấy *in vitro*.

**Đối với môi trường bổ sung D-glucose:** Bảng 3 cho thấy ở nghiệm thức G1 (20 g/L D-glucose, phòng thí nghiệm), số lượng PLB tạo thành là cao nhất (244,20 PLB) và khác biệt có ý nghĩa ở mức 5% so với các nghiệm thức khác. Tương tự với kết quả của thí nghiệm khảo sát với đường sucrose, khi nồng độ đường tăng dần thì số PLB tạo thành giảm mạnh, cụ thể ở nghiệm thức G3 và G3' (40 g/L D-glucose) có số PLB nhân lên rất thấp.

**Bảng 3: Ảnh hưởng nồng độ đường D-glucose và chế độ ánh sáng lên quá trình nhân PLB**

Nghiệm thức	Nồng độ đường (g/L)	Chế độ ánh sáng	PLB được tạo thành		
			4 tuần	6 tuần	8 tuần
G1	20	PTN	115,0 <sup>a</sup>	165,2 <sup>a</sup>	244,20 <sup>a</sup>
G1'	20	TN	16,50 <sup>c</sup>	60,8 <sup>bcd</sup>	151,80 <sup>b</sup>
G2	30	PTN	56,8 <sup>b</sup>	85,50 <sup>b</sup>	102,20 <sup>bc</sup>
G2'	30	TN	13,00 <sup>c</sup>	13,33 <sup>d</sup>	8,67 <sup>c</sup>
G3	40	PTN	13,50 <sup>c</sup>	59,50 <sup>bcd</sup>	80,67 <sup>bcd</sup>
G3'	40	TN	8,67 <sup>c</sup>	36,67 <sup>bcd</sup>	58,83 <sup>cde</sup>
ĐC	0	PTN	45,17 <sup>b</sup>	78,00 <sup>bc</sup>	116,3 <sup>bc</sup>
ĐC'	0	TN	19,33 <sup>c</sup>	35,67 <sup>cd</sup>	33,50 <sup>de</sup>
A (đường)			**	**	**
B (ánh sáng)			**	**	**
A x B			**	ns	ns

Các nghiệm thức có cùng mẫu tự không khác biệt nhau theo phân hạng LSD-Test.

Ký hiệu: ns, \*\*, \*: không khác biệt hoặc khác biệt ở mức  $p < 0,01$  và  $0,05$  theo xử lý ANOVA hai nhân tố.

PTN: phòng thí nghiệm, TN: tự nhiên

**Đối với môi trường bổ sung D-fructose:** Ở thí nghiệm này, mặc dù mật số PLB được nhân lên của môi trường có đường D-fructose ít hơn so với đường sucrose và D-glucose nhưng kết quả cho thấy số PLB vẫn được nhân lên ở các nghiệm thức và nhìn

chung vẫn duy trì sự phát triển theo thời gian. Kết quả của Bảng 4 chứng tỏ ở nồng độ 20 g/L thích hợp hơn với sự nhân mật số PLB, khi nồng độ D-fructose càng cao càng làm mẫu kém phát triển, một số nghiệm thức bắt đầu giảm mật số theo thời gian.

**Bảng 4: Ảnh hưởng nồng độ đường D-fructose và chế độ ánh sáng lên quá trình nhân PLB**

Nghiệm thức	Nồng độ đường (g/L)	Chế độ ánh sáng	PLB được tạo thành		
			4 tuần	6 tuần	8 tuần
F1	20	PTN	58,33 <sup>a</sup>	96,00 <sup>a</sup>	140,30 <sup>a</sup>
F1'	20	TN	36,33 <sup>b</sup>	51,17 <sup>b</sup>	66,33 <sup>b</sup>
F2	30	PTN	20,00 <sup>c</sup>	29,83 <sup>bc</sup>	54,33 <sup>bc</sup>
F2'	30	TN	10,00 <sup>cd</sup>	14,00 <sup>cd</sup>	13,50 <sup>cd</sup>
F3	40	PTN	6,00 <sup>cd</sup>	25,67 <sup>c</sup>	87,17 <sup>bc</sup>
F3'	40	TN	0,17 <sup>d</sup>	0,17 <sup>d</sup>	0,67 <sup>f</sup>
ĐC	0	PTN	45,17 <sup>ab</sup>	78,00 <sup>a</sup>	116,30 <sup>ab</sup>
ĐC'	0	TN	19,33 <sup>c</sup>	35,67 <sup>bc</sup>	33,50 <sup>def</sup>
A (đường)			**	**	**
B (ánh sáng)			**	**	**
A x B			**	ns	ns

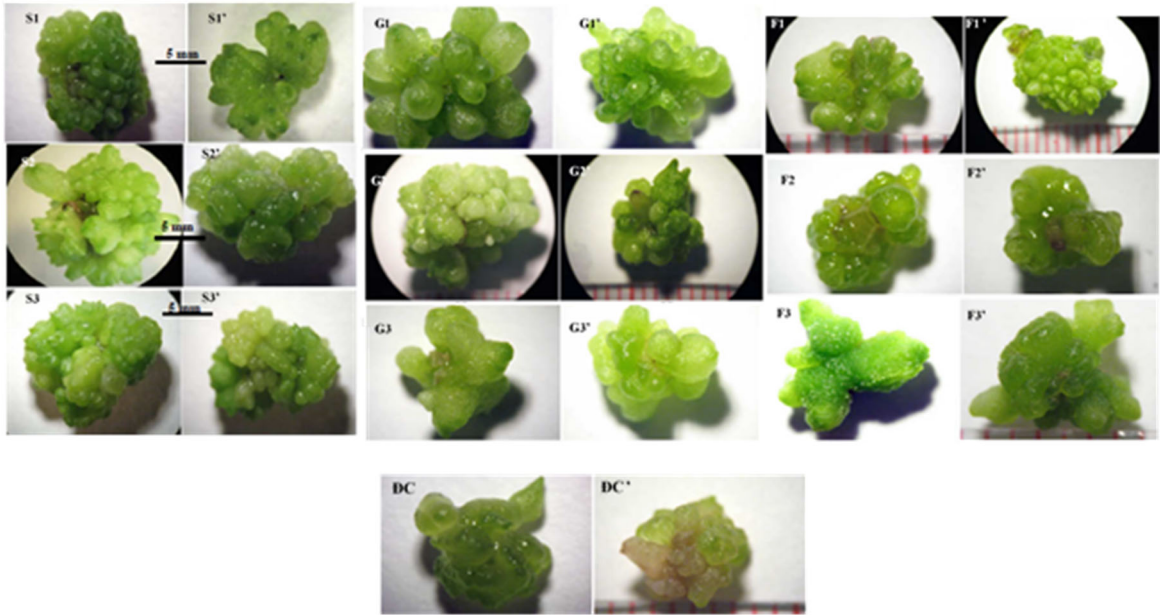
Các nghiệm thức có cùng mẫu tự không khác biệt nhau theo phân hạng LSD-Test.

Ký hiệu :ns, \*\*, \*: không khác biệt hoặc khác biệt ở mức  $p < 0,01$  và  $0,05$  theo xử lý ANOVA hai nhân tố.

PTN: phòng thí nghiệm, TN: tự nhiên

– Chỉ tiêu màu sắc PLB: Các PLB của các nghiệm thức trong phòng thí nghiệm nhìn chung có

màu xanh đậm hơn trong nhà lưới, phát triển thành cụm dính nhau, có hình cầu.



**Hình 2: Màu sắc PLB sau 8 tuần của thí nghiệm 1**

Cây lan nuôi cấy *in vitro* có hiện tượng gia tăng hàm lượng diệp lục tố và carotenoid dưới tác động của ánh sáng tự nhiên tại nhà lưới (Ngô Thanh Phú và Nguyễn Bảo Toàn, 2014). Tuy nhiên, ánh sáng ảnh hưởng rất lớn đến sự hình thành và nhân mật số của PLB trong nuôi cấy *in vitro*. Mayer *et al.* (2010) báo cáo rằng trong điều kiện nuôi cấy không chiếu sáng, PLB hình thành và nhân mật số với hiệu suất 80%, trong khi đó ở điều kiện chiếu sáng 16 giờ, 95% mẫu nuôi cấy lan *Oncidium flexuosum* Sims bị hỏng không thể tạo PLB. Theo Habiba *et al.* (2014) PLB trung bình được tạo ra cao nhất dưới tác dụng của ánh sáng đèn led xanh dương khi so sánh với các nguồn sáng khác. Như vậy, tuy ánh sáng có vai trò quan trọng trong sự hình thành và phát triển của PLB nhưng cường độ và phổ ánh sáng cũng có tác động tiêu cực đến PLB. Vì vậy, có thể do biến động về cường độ chiếu sáng trong ngày và phổ sóng của ánh sáng tự nhiên nên ảnh hưởng đến quá trình biến dưỡng của PLB trong các nghiệm thức bố trí ở dọc hành lang phòng thí nghiệm.

**3.2 Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của hỗn hợp các nguồn carbon và chế độ ánh sáng lên sự nhân mật số PLB**

- Chỉ tiêu về quá trình nhân mật số của PLB

So sánh về sự nhân mật số PLB dưới ảnh hưởng của chế độ ánh sáng cho thấy ánh sáng tự nhiên không thích hợp cho quá trình phát triển của PLB. Số liệu của Bảng 5 cho thấy cũng giống như các thí nghiệm 1, mật số PLB dưới ánh sáng tự nhiên trong

thí nghiệm này ít hơn trong điều kiện phòng thí nghiệm. Sự kết hợp đường trong thí nghiệm đem lại các kết quả rất khác biệt. Từ kết quả của các thí nghiệm trước cho thấy đường đơn (D-glucose và D-fructose) không thích hợp hơn đường đôi (sucrose) trong quá trình nhân mật số PLB, đặc biệt đối với đường D-fructose khả năng nhân mật số PLB rất ít. Tuy nhiên trong thí nghiệm này, ở nghiệm thức có sự kết hợp giữa hai loại đường đơn D-glucose và D-fructose lại cho kết quả tốt nhất so với các nghiệm thức khác trong ánh sáng tự nhiên. Đường glucose và fructose là những đường đơn (monosaccharides) ít tốn năng lượng và dễ tổng hợp hơn sucrose (Teixeira *et al.*, 2007). Tuy nhiên, theo Hew (1998) tất cả các nghiên cứu nuôi cấy và nhân giống mô lan đều sử dụng sucrose như nguồn carbon chính, mặc dù các nguồn khác như glucose hoặc fructose đều phù hợp cho lan *Phalaenopsis* và *Dendrobium*. Theo Teixeira *et al.* (2007) thì bất kỳ đường đơn nào, ngoại trừ mannose và xylose đều tạo được số lượng PLB tương tự như PLB được nuôi cấy từ phương pháp nuôi cấy mô tế bào mảnh lá (tTCL - transverse thin cell layer) như khi sử dụng sucrose để nuôi cấy. Tuy nhiên, việc sử dụng đường đơn D-glucose và D-fructose để nuôi cấy PLB không đem lại hiệu quả như sử dụng đường sucrose như ở thí nghiệm 1. Trong thí nghiệm 2 việc kết hợp giữa hai loại đường đơn lại cho kết quả tốt nhất khi kết hợp từng cặp 3 loại đường với nhau. Đây có thể do sự kết hợp hai loại đường đơn thích hợp với quá trình biến dưỡng của PLB lan *Dendrobium* Sonia.

**Bảng 5: Ảnh hưởng hỗn hợp các loại đường và chế độ ánh sáng lên quá trình nhân PLB**

Nghiệm thức	Chế độ ánh sáng	PLB được tạo thành		
		4 tuần	6 tuần	8 tuần
SG	PTN	70,67 <sup>a</sup>	127,2 <sup>b</sup>	281,3 <sup>b</sup>
GF	TN	90,67 <sup>a</sup>	237,2 <sup>a</sup>	735,7 <sup>a</sup>
SF	PTN	31,67 <sup>bc</sup>	71,00 <sup>cd</sup>	139,7 <sup>b</sup>
SG'	TN	17,83 <sup>cd</sup>	23,33 <sup>de</sup>	42,5 <sup>b</sup>
GF'	PTN	6,167 <sup>d</sup>	13,8 <sup>e</sup>	13,83 <sup>b</sup>
SF'	TN	16,33 <sup>cd</sup>	20,00 <sup>e</sup>	28,33 <sup>b</sup>
ĐC	PTN	45,17 <sup>b</sup>	78,00 <sup>c</sup>	116,30 <sup>b</sup>
ĐC'	TN	19,33 <sup>cd</sup>	35,67 <sup>cde</sup>	33,50 <sup>b</sup>
A (đường)		**	**	**
B (ánh sáng)		**	**	**
A x B		**	ns	Ns

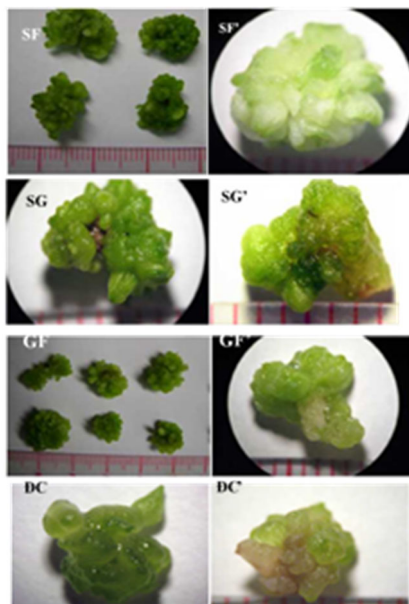
Các nghiệm thức có cùng mẫu tự không khác biệt nhau theo phân hạng LSD-Test.

Ký hiệu: ns, \*\*, \*: không khác biệt hoặc khác biệt ở mức  $p < 0,01$  và  $0,05$  theo xử lý ANOVA hai nhân tố.

PTN: phòng thí nghiệm, TN: tự nhiên

– **Chỉ tiêu màu sắc PLB:** PLB có màu xanh đậm nhất ở nghiệm thức SF và GF. PLB có hình cầu, dễ tách riêng lẻ và phát triển mạnh. Màu sắc của PLB trong thí nghiệm 2 cũng tương tự như các thí nghiệm trước, PLB được hình thành trong phòng thí nghiệm có màu xanh đậm hơn so với các nghiệm

thức bố trí tại hành lang dọc phòng thí nghiệm. Điều này là do điều kiện chiếu sáng ổn định trong phòng thí nghiệm tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình biến dưỡng diễn ra trong thể tiền chồi. Ngược lại, với sự biến động lớn cả về thời gian và cường độ chiếu sáng trong ngày, PLB gặp khó khăn trong quá trình nhân mật số và màu sắc mô đồng thời bị ảnh hưởng.



- Điều kiện PTN:  
 SF: môi trường sử dụng sucrose và fructose  
 SG: môi trường sử dụng sucrose và glucose  
 GF: môi trường sử dụng glucose và fructose  
 ĐC: môi trường đối chứng  
 - Điều kiện TN:  
 SF': môi trường sử dụng sucrose và fructose  
 SG': môi trường sử dụng sucrose và glucose  
 GF': môi trường sử dụng glucose và fructose  
 ĐC': môi trường đối chứng

**Hình 3: Màu sắc PLB sau 8 tuần của thí nghiệm 2**

**4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT**

**4.1 Kết luận**

Quá trình nhân mật số PLB lan *Dendrobium* Sonia thì đường disaccharide (sucrose) thích hợp để nuôi cấy PLB *in vitro* hơn các loại đường monosaccharide (D- glucose, D-fructose). Môi trường bổ sung nồng độ đường 20 g/L thích hợp hơn

cho sự phát triển của PLB. Ánh sáng tự nhiên không thích hợp cho quá trình nhân mật số PLB, nhưng kích ứng PLB tạo chồi, thích hợp cho giai đoạn biệt hóa từ PLB lên giai đoạn chồi trong nuôi cấy *in vitro*. Sự kết hợp giữa D-glucose và D-Fructose trong cùng môi trường nuôi cấy phát triển tốt hơn sự kết hợp của sucrose và D-glucose.

## 4.2 Đề xuất

Tiếp tục khảo sát khả năng nhân PLB ở các nồng độ đường sucrose thấp hơn 20 g/L. Nghiên cứu nồng độ đường kết hợp giữa D-glucose và D-Fructose thấp hơn 30 mg/L và kết hợp điều kiện ánh sáng tự nhiên để tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của hai loại đường đơn này trong nuôi cấy nhân mật số PLB lan *Dendrobium Sonia in vitro*.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Batista, D. S., Felipe, S. H. S., Silva, T. D., et al, 2018. Light quality in plant tissue culture: does it matter? In: Vitro cellular and developmental biology – plant. New York. 54(3): 195–215.
- Bauer, J., Hiltbrunner, A. and Kessler, F. 2001. Molecular biology of chloroplast biogenesis: gene expression, protein import and intraorganellar sorting. Cell Mol. Life Sci. 58: 420-433.
- Chugh, S., Guha, S., Rao IU, 2009. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. Scientia Horticulturae 122: 507-520.
- Dodds, J. H. and Roberts, L. W., 1985. Experiments in plant tissue culture. second edition. Cambridge University Press. New York. 348 pages.
- Fang, S. C., Chen, J. C., Wei, M. J., 2016. Protocorms and Protocorm-Like Bodies Are Molecularly Distinct from Zygotic Embryonic Tissues in Phalaenopsis aphrodite. Plant Physiology Preview. 171(4): 2682-2700.
- Kozai, T., 2016. Why LED lighting for urban agriculture? In: Kozai T, Fujiwara K, Runkle E (eds) LED lighting for urban agriculture. Springer. 3–18.
- Habiba, S. U., Shimasaki, K. and Kochi, M. M. A., 2014. Effects of different light quality on growth and development of Protocorm-Like Bodies (PLB) in *Dendrobiumkingianum* cultured in vitro. Bangladesh Research Publications Journal. 10(2): 223–227.
- Hart, J. W., 2012. General introduction. In: Hart JW (ed) Light and plant growth. Topics in plant physiology. Springer Science and Business Media. 1: 4–17.
- Hew, C., Ting, S. and Chia, T., 1988. Substrate utilization by *Dendrobium* tissues. Botanical Gazette. 149(2): 153-157.
- Jones, D., Tisserat, B., 1990. Clonal propagation of orchids. Methods Mol Biol 6: 181-191.
- Mayer, J. L. S., Stancato, G. C. and Appezzato-Da-Glória, B., 2010. Direct regeneration of protocorm-like bodies (PLB) from leaf apices of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 103(3): 411–416.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.
- Ngô Thanh Phú và Nguyễn Bảo Toàn, 2014. Ảnh hưởng phối hợp của màu sắc ánh sáng và chất điều hòa sinh trưởng lên sự sinh trưởng in vitro của lan *Dendrobium*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số Chuyên Đề: Nông Nghiệp. (4): 57-62.
- Nguyễn Thị Pha, Trần Thị Xuân Mai, Lê Thị Mai Trang và Nguyễn Thị Liên, 2011. Nuôi cấy mầm ngủ phát hoa lan hồ điệp (*Phalaenopsis* sp.). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. (20b): 15-20.
- Tokuhara, K. and Mii, M., 2003. Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of phalaenopsis orchids by adjusting carbohydrate sources. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. 39: 635.
- Teixeira, J., Giang, D. T. T., Chan, M. T., et al, 2007. The Influence of Different Carbon Sources, Photohetero-, Photoauto- and Photomixotrophic Conditions on Protocorm-Like Body Organogenesis and Callus Formation in Thin Cell Layer Culture of Hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae), Orchid Science and Biotechnology 1: 15-23.
- Uddain, J., Gnasekaran, P., Zakaria, L., Lynn, C. B. and Subramaniam, S., 2015. The effect of different growth media, carbon source and PGRs on *Dendrobium Broga* Giant orchid's protocorm-like bodies (PLB) proliferation supported with SEM and TEM analysis. Pakistan Journal of Botany. 47(2): 587–593.
- Udomdee, W., Wen, P. J., Chin, S. W. and Chen, F. C., 2015. Effect of carbon source on protocorm-like body induction, proliferation and regeneration in *Dendrobium snowflake* “red star.” Acta Horticulturae International Society for Horticultural Science (ISHS). 1078: 113-120.
- Restanto, D. P., Santoso, B., Kriswanto, B. and Supardjono, S, 2016. The application of chitosan for protocorm like bodies (PLB) induction of Orchid (*Dendrobium* sp) In Vitro. Agriculture and Agricultural Science Procedia. 9: 462–468.
- Koch, K.E., 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47: 509-540.