Nghiên cứu khả năng nhân nhanh và tạo cây hoàn chỉnh của chồi Vanilla *(Vanilla planifolia* Andr.*) in vitro*

Trần Thị Triêu Hà*, Lã Thị Thu Hằng, Vũ Tuấn Minh, Trần Thị Phương Nhung, Trần Thị Xuân Phương

Trường Đại học Nông lâm, Đại học Huế

Ngày nhận bài 20/3/2018; ngày chuyển phản biện 26/3/2018; ngày nhận phản biện 23/4/2018; ngày chấp nhận đăng 27/4/2018

Tóm tắt:

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích xây dựng quy trình nhân nhanh và tạo cây Vanilla hoàn chỉnh *in vitro*. Chồi Vanilla *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường cơ bản MS (Murashige and Skoog) có bổ sung nước dừa và các chất kích thích sinh trưởng (KTST) để thăm dò khả năng nhân nhanh và tạo cây hoàn chỉnh của chúng. Kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường nuôi cấy cơ bản MS được bổ sung 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l IBA và 10% nước dừa cho kết quả nhân chồi tốt nhất với 5,4 chồi/mẫu, chiều cao chồi trung bình là 2,03 cm, số lá trung bình là 3,67 sau 8 tuần nuôi cấy. Thí nghiệm cũng cho thấy, môi trường nuôi cấy cơ bản MS bổ sung 1 mg/l NAA có tỷ lệ chồi tạo rễ đạt 96,67% và số rễ đạt nhiều nhất là 3,13 rễ/chồi.

Từ khóa: ***In vitro, nhân nhanh, tạo cây hoàn chỉnh, Vanilla.***

Chỉ số phân loại: *4.6*

Đặt vấn đề

Vanilla planifolia Andr. là một loài lan cho hương liệu được ứng dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm. Tinh dầu Vanilin được chiết xuất từ quả Vanilla là loại hương liệu đắt giá thứ hai thế giới, sau nghệ tây [1]. Trên thế giới, loài cây này được trồng nhiều ở Madagasca, Mexico, Indonesia… [2]. Thông thường, Vanilla được nhân giống bằng phương pháp truyền thống như giâm cành. Tuy nhiên, phương pháp này có hệ số nhân giống thấp, mất nhiều thời gian và hiệu quả kinh tế không cao [3, 4]. Để đáp ứng nhu cầu ngày càng cao về cây giống Vanilla, các nhà khoa học trên thế giới đã tập trung nghiên cứu, ứng dụng kỹ thuật nhân giống *in vitro* cây Vanilla và đã đạt được nhiều thành công. Các tác giả đã nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Vanilla thông qua nuôi cấy mô sẹo, protocorm, nuôi cấy chồi đỉnh, chồi nách... [1-11].

Việt Nam có điều kiện sinh thái phù hợp cho quá trình sinh trưởng và phát triển của cây Vanilla [12]. Trong những năm gần đây, cây Vanilla đã được đưa vào trồng thử nghiệm ở nhiều địa phương như Bình Thuận, Đăk Lăk, Thừa Thiên - Huế và có khả năng sinh trưởng, phát triển tốt [13]. Tuy nhiên, việc cung cấp một số lượng cây giống lớn, có độ đồng đều cao hầu như chưa được thực hiện ở Việt Nam. Các công trình nghiên cứu khoa học về nhân giống *in vitro* cây Vanilla tuy đã có nhưng còn rất ít và chưa hoàn chỉnh thành quy trình sản xuất [14-16]. Vì vậy, việc nghiên cứu hoàn thiện quy trình sản xuất giống cây Vanilla *in vitro* để phục vụ sản xuất mang ý nghĩa thực tiễn quan trọng.

Trong nghiên cứu này, các tác giả trình bày kết quả về khả năng nhân nhanh và tạo cây Vanilla hoàn chỉnh *in vitro,* làm cơ sở cho việc sản xuất một lượng lớn cây giống đáp ứng nhu cầu sản xuất.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu được sử dụng cho các thí nghiệm là chồi Vanilla *in vitro* từ công trình [16] do các tác giả thực hiện tại Phòng thí nghiệm Nuôi cấy mô tế bào thực vật, Trường Đại học Nông lâm, Đại học Huế; chồi có kích thước khoảng 0,5 cm.

Phương pháp nghiên cứu

Nhân nhanh chồi in vitro: Chồi Vanilla *in vitro* được cấy lên môi trường cơ bản MS (Murashige and Skoog) bổ sung thêm 25 g/l đường saccharose, 6,5 g/l agar, các chất KTST là BAP (benzyl aminopurin), IBA (indole butyric acid) và nước dừa với các nồng độ khác nhau để thăm dò khả năng nhân chồi của chúng.

Tạo cây hoàn chỉnh: Các chồi *in vitro* (1,5-2 cm) tách từ các cụm chồi được cấy lên môi trường cơ bản MS bổ sung thêm 25 g/l đường saccharose, 6,5 g/l agar, các chất KTST là α-NAA (naphthlene acetic acid) với các nồng độ khác nhau để thăm dò khả năng tạo rễ và phát triển thành cây hoàn chỉnh.

Bố trí thí nghiệm: Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn

*Tác giả liên hệ: Email: tranthitrieuha@huaf.edu.vn

Study on the rapid multiplication and planlets regeneration of *Vanilla planifolia* Andr.

Thi Trieu Ha Tran*, Thi Thu Hang La, Tuan Minh Vu, Thi Phuong Nhung Tran, Thi Xuan Phuong Tran

College of Agriculture and Forestry, Hue University

Received 20 March 2018; accepted 27 April 2018

Abstract:

This study was worked out to determine the protocol for rapid multiplication and planlet regeneration of *Vanilla planifolia.* The explants were cultured on the Murashige and Skoog (MS) basal medium containing 3% sucrose and 0.65% agar supplemented with coconut water and different plant growth regulators, either alone or in combination. The results indicated that the MS medium supplemented with 1 mg/l BAP, 0.1 mg/l IBA and 10% coconut water was most suitable for shoot multiplication with 5.4 shoots/explant, the average shoot height of 2.03 cm, the average leaf number of 3.67. Our experiments also showed that shoots were rooted on the MS medium with 1 mg/l NAA had the highest rooting percentage of 96.67%, and the highest number of roots was 3.13 roots/ plantlet.

Keywords: ***In vitro, plantlets regeneration, rapid multiplication, Vanilla planifolia.***

Classification number: ***4.6***

ngẫu nhiên (CRD), lặp lại 3 lần (mỗi công thức có 6 bình, mỗi bình có 5 mẫu), thực hiện trong điều kiện nhân tạo, nhiệt độ 25±2°C, cường độ ánh sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 14 h/ngày.

Các chỉ tiêu theo dõi: Các số liệu thí nghiệm được theo dõi sau 8 tuần nuôi cấy gồm: Số chồi/mẫu (chồi), chiều cao chồi trung bình (cm), số lá/chồi (lá), tỷ lệ chồi ra rễ (%), số rễ/cây (rễ), chiều dài rễ (cm).

Số liệu thí nghiệm được xử lý trên phần mềm Microsoft Excel và Statictics 10.0.

Thời gian và địa điểm nghiên cứu: Thí nghiệm được tiến hành từ tháng 6/2017 tại Phòng thí nghiệm Nuôi cấy mô tế bào thực vật, Khoa Nông học, Trường Đại học Nông lâm, Đại học Huế.

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Khả năng nhân nhanh của chồi Vanilla in vitro

Mục đích của kỹ thuật nhân giống vô tính *in vitro* là tạo ra một số lượng lớn các cá thể đồng nhất về mặt di truyền, sinh trưởng và phát triển một cách đồng đều, mang những đặc điểm hoàn toàn giống với cá thể mẹ. Trong giai đoạn này, ngoài các chất dinh dưỡng cần thiết, môi trường nuôi cấy cần phải bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm auxin và cytokinin. BAP là một trong những cytokinin tổng hợp được dùng phổ biến trong phòng thí nghiệm do nó có hoạt tính cao và bền với nhiệt độ. Loại cytokinin này ảnh hưởng rất rõ rệt lên sự hình thành và phân hóa cơ quan của thực vật, đặc biệt là sự phân hóa chồi [17].

Thí nghiệm này nhằm nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ BAP (mg/l) đến khả năng nhân nhanh của chồi Vanilla *in vitro*. Kết quả sau 8 tuần theo dõi được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân nhanh của chồi Vanilla *in vitro.*

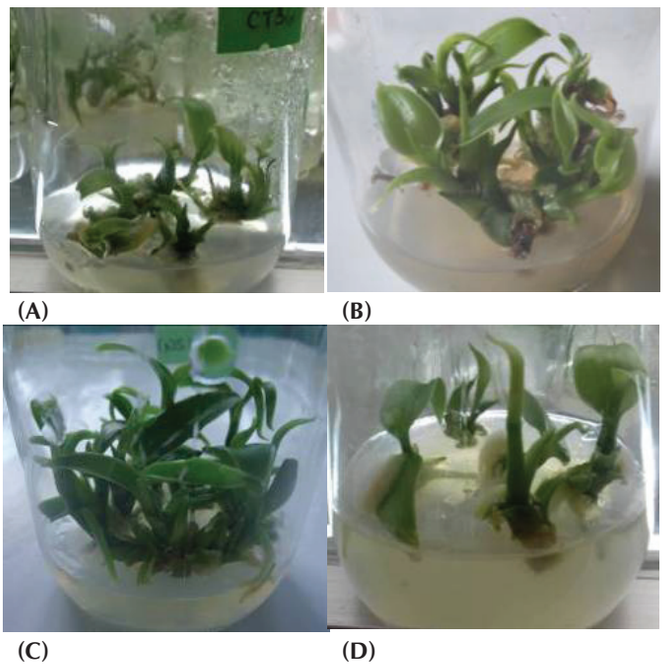
BAP (mg/l)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá (lá/chồi)
0 (Đ/C)	1,47^{c}	4,68^{a}	2,10^{c}
0,5	3,17^{ab}	1,47^{b}	2,93^{b}
1	3,70^{a}	1,40^{bc}	3,43^{a}
1,5	2,90^{b}	1,16^{bc}	1,17^{d}
2	2,83^{b}	0,83^{c}	0,80^{d}
$LSD_{0,05}$	*0,59*	*0,60*	*0,49*

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái (a, b, c...) khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa giữa các công thức ở mức α = 0,05. Đ/C: đối chứng.

Số liệu ở bảng 1 cho thấy, khi bổ sung BAP vào môi trường nuôi cấy có tác dụng thúc đẩy tạo chồi khá tốt. Nồng độ BAP tăng từ 0 đến 1 mg/l thì hệ số nhân chồi tăng lên. Môi trường bổ sung BAP ở nồng độ 1 mg/l cho kết quả tốt nhất (hình 1A). Chồi sinh trưởng tốt, khỏe và xanh, số chồi tạo thành lớn nhất, sau 8 tuần nuôi đạt 3,7 chồi/mẫu. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nồng độ BAP từ 1,5 đến 2 mg/l thì hệ số nhân chồi bắt đầu giảm xuống nhưng vẫn cao hơn so với công thức đối chứng.

So sánh với kết quả nghiên cứu của tác giả Abebe và cộng sự [8] thì kết quả của chúng tôi thu được có khả quan hơn. Các tác giả này khi nuôi cấy chồi Vanilla trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l BAP, số chồi tạo thành sau 45 ngày nuôi cấy là 3,17 chồi/mẫu [8].

Trong nhân giống *in vitro*, sự kết hợp giữa hai nhóm chất KTST là auxin và cytokinin với một tỷ lệ thích hợp có ý nghĩa quan trọng quyết định tăng hệ số nhân chồi và chất lượng chồi [17]. Vì vậy, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu ảnh



Hình 1. Chồi Vanilla *in vitro* sau 8 tuần nuôi. (A) Chồi Vanilla trên môi trường có 1 mg/l BAP; **(B)** Chồi Vanilla trên môi trường có 1 mg/l BAP và 0,1 mg/l IBA; **(C)** Chồi Vanilla trên môi trường có 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l IBA và 10% nước dừa; **(D)** Cây Vanilla trong môi trường bổ sung 1 mg/l α-NAA.

hưởng kết hợp giữa BAP và IBA đến hệ số nhân chồi. Trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng chồi nách *in vitro* cấy lên môi trường nuôi cấy cơ bản bổ sung BAP (1 mg/l) kết hợp với IBA ở các nồng độ khác nhau. Kết quả thí nghiệm sau 8 tuần nuôi được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BAP kết hợp với IBA đến khả năng nhân nhanh của chồi Vanilla.

Chất KTST (mg/l)		Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá (lá/chồi)
BAP	*IBA*			
1 (Đ/C)	0	3,7^{b}	1,59^{a}	3,43^{a}
1	0,1	4,33^{a}	1,40^{a}	3,03^{a}
1	0,2	3,2^{b}	1,37^{a}	2,27^{b}
1	0,3	2,27^{c}	1,35^{a}	1,33^{c}
1	0,4	2,5^{c}	1,32^{a}	1,67^{c}
$LSD_{0,05}$		*0,58*	*0,28*	*0,55*

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái (a, b, c...) khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa giữa các công thức ở mức α = 0,05.

Số liệu ở bảng 2 cho thấy, môi trường có 1 mg/l BAP kết hợp với 0,1 mg/l IBA cho kết quả tạo chồi tốt nhất với số chồi/mẫu tạo thành sau 8 tuần là 4,33 chồi, chiều cao chồi và số lá cũng lớn nhất (hình 1B). Trên môi trường này, chồi sinh trưởng mạnh, thân và lá có kích thước lớn. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nồng độ IBA lên 0,2-0,4 mg/l thì hệ số nhân cũng như số lá giảm trong khi chiều cao thì không thay đổi. Theo Abebe và cộng sự (2009), khi nuôi cấy chồi trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l BAP số chồi/mẫu sau 45 ngày nuôi cấy là 3,17. Khi kết hợp với α-NAA, một chất trong nhóm auxin cùng với IBA, nồng độ từ 0,5 đến 1,25 mg/l thì các tác giả này thu được kết quả tốt nhất ở môi trường có bổ sung 1 mg/l BAP kết hợp với 0,75 mg/l α-NAA với số chồi/mẫu là 3,5 chồi [8].

Trong nghiên cứu nhân giống *in vitro*, đặc biệt là trong nhân giống *in vitro* các loài lan, người ta thường bổ sung nước dừa vào môi trường nuôi cấy để cải thiện hệ số nhân chồi và chất lượng chồi. Để tiếp tục nghiên cứu làm tăng hệ số nhân chồi Vanilla *in vitro*, chúng tôi sử dụng môi trường cơ bản MS có 1 mg/l BAP và 0,1 mg/l IBA bổ sung thêm nước dừa với các nồng độ 5-20% vào môi trường nuôi cấy để khảo sát ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng nhân nhanh và chất lượng chồi Vanilla. Kết quả sau 8 tuần theo dõi được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng nhân nhanh của chồi Vanilla *in vitro.*

Nước dừa (%)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá (lá/chồi)
0 (Đ/C)	4,33^{b}	1,59^{bc}	3,03^{b}
5	4,7^{b}	1,38^{c}	3,1^{b}
10	5,4^{a}	2,03^{a}	3,67^{a}
15	3,57^{c}	1,59^{bc}	3,03^{b}
20	3,43^{c}	1,97^{ab}	2,9^{b}
$LSD_{0,05}$	*0,63*	*0,40*	*0,52*

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái (a, b, c...) khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa giữa các công thức ở mức α = 0,05.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, môi trường bổ sung 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l IBA và 10% nước dừa cho kết quả tốt nhất. Số chồi/mẫu đạt 5,4 chồi, chiều cao chồi trung bình là 2,03 cm và số lá/chồi đạt 3,67 lá. Chồi sinh trưởng khỏe mạnh, lá có màu xanh đậm (hình 1C). Tuy nhiên khi tiếp tục tăng nồng độ nước dừa lên 15 và 20% thì không làm tăng số chồi tạo thành mà ngược lại. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của các tác giả P. Giridhar, G.A. Ravishankar khi nghiên cứu nhân nhanh chồi Vanilla *in vitro* cũng xác định rằng bổ sung nước dừa với nồng độ 10% có tác dụng làm tăng hệ số nhân và chất lượng chồi [1].

Tạo cây Vanilla hoàn chỉnh in vitro

Trong thí nghiệm này, các chồi Vanilla *in vitro* có kích thước 1,5-2 cm tách từ cụm chồi được cấy lên môi trường nuôi cấy cơ bản MS có bổ sung α-NAA với các nồng độ

khác nhau để thăm dò khả năng tạo cây hoàn chỉnh. Kết quả sau 8 tuần được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của α-NAA đến khả năng tạo cây hoàn chỉnh của chồi Vanilla *in vitro.*

α-NAA (mg/l)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ/cây (rễ)	Chiều dài rễ (cm)
0 (Đ/C)	70	$1,5^{c}$	$4,50^{b}$
0,5	80	$2,23^{b}$	$5,15^{ab}$
1	96,67	$3,13^{a}$	$6,90^{a}$
1,5	80	$1,93^{bc}$	$4,65^{b}$
2	83,33	$2,07^{bc}$	$4,42^{b}$
$LSD_{0,05}$		*0,65*	*1,84*

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái (a, b, c,...) khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa giữa các công thức ở mức mức α = 0,05.

Số liệu ở bảng 4 cho thấy, ở công thức đối chứng khi không bổ sung chất kích thích tạo rễ là α-NAA chồi Vanilla cũng có khả năng tạo rễ với tỷ lệ khá cao là 70%, tuy nhiên số lượng rễ/cây thấp (1,5 rễ/cây), rễ nhỏ. Khi nồng độ α-NAA tăng từ 0 đến 1 mg/l thì tỷ lệ chồi ra rễ càng tăng dần, và đạt kết quả tốt nhất ở môi trường có bổ sung 1 mg/l α-NAA. Tỷ lệ chồi ra rễ đạt cao nhất (96,67%), cây sinh trưởng khỏe mạnh, số rễ trung bình trên cây đạt 3,13 rễ, chiều dài rễ đạt 6,90 cm (hình 1D). Tiếp tục tăng nồng độ α-NAA lên đến đến 2 mg/l thì tỷ lệ chồi ra rễ giảm dần nhưng vẫn cao hơn so với công thức đối chứng.

Nghiên cứu của Zuraida và cs (2013) cho thấy, môi trường MS có 1 mg/l α-NAA là thích hợp cho chồi Vanilla *in vitro* tạo rễ , sau 8 tuần nuôi cấy, tỷ lệ tạo rễ đạt 80% với 2,5 rễ/chồi, chiều dài rễ là 2,45 cm [4]. So với kết quả này, kết quả của chúng tôi có phần khả quan hơn với tỷ lệ chồi tạo rễ là 96,67%, số rễ trung bình trên một chồi là 3,13.

Kết luận

Qua kết quả nghiên cứu khả năng nhân nhanh và tạo cây hoàn chỉnh của chồi Vanilla *in vitro*, chúng tôi đưa ra một số kết luận sau:

- Môi trường cơ bản MS có 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l IBA và 10% nước dừa cho kết quả nhân chồi tốt nhất với số chồi/mẫu tạo thành sau 8 tuần nuôi là 5,4 chồi. Chồi sinh trưởng khỏe mạnh.

- Môi trường cơ bản MS có 1 mg/l α-NAA cho kết quả tạo cây hoàn chỉnh tốt nhất, có tỷ lệ chồi tạo rễ đạt 96,67%, số rễ trung bình trên chồi là 3,13.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] P. Giridhar, G.A. Ravishankar (2004), "Efficient micropropagation of Vanilla planifolia Andr.under the influence of thidiazuron, zeatin and coconut milk", *Indian J. Biotech.*, **3**, pp.113-118.

[2] S. Menon, N. Nayeem (2013), "Vanilla planfolia: A review of a plant commonly used as flavouring agent", *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, **20(2)**, pp.225-228.

[3] K. Kalimuthu, R. Senthilkumar, N. Murugalatha (2006), "Regeneration and mass multiplication of Vanilla planifolia Andr: a tropical orchid", *Curr. Sci.,* **91(10),** pp.1401-1403.

[4] A.R. Zuraida, K. Izzati1, O.A. Nazreena1, W.S.W. Zaliha (2013), "A Simple and Efficient Protocol for the Mass Propagation of Vanilla planifolia", *American Journal of Plant Sciences*, **4**, pp.1685-1692.

[5] P.S. George, G.A. Ravishankar (1997), "In vitro multiplication of Vanilla planifolia using axillary bud explants", *Plant Cell Rep.*, **16**, pp.490-494.

[6] S. Geetha, S.A. Shetty (2000), "In vitro propagation of Vanilla planifolia, a tropical orchid", *Curr. Sci.* , **79(6)**, pp.886-889.

[7] H.E.L. Espinosa, J. Gonza´lez, B. Garcı´a-Rosas, A. Co´rdova, L. Pe´rez, L.G. Iglesias-Andreu, N. Santana-Buzzy (2008), "In vitro Clonal Propagation of Vanilla (Vanilla planifolia 'Andrews')", *Hort. Sci.*, **43(2)**, pp.454-458.

[8] Z. Abebe, A. Mengesha, A. Teressa, W. Tefera (2009), "Efficient in vitro multiplication protocol for Vanilla planifolia using nodal explants in Ethiopia", *Afr. J. Biotechnol*., **8**, pp.6817-6821.

[9] A. Mengesha, B. Ayenew, E. Gebremariam, T. Tadesse (2012), "Micro-Propagation of *Vanilla planifolia* Using Enset (*Ensete ventricosum*) Starch as a Gelling Agent", *Current Research Journal of Biological Sciences*, **4(4)**, pp.519-525.

[10] S. Ruby, B. Sunil (2016), "In vitro sterilization protocol of Vanilla planifolia explants for micropropagation", *International Journal of Research in Applied, Natural and Social Sciences*, **4(11)**, pp.135-142.

[11] B. Janarthanam, S. Seshadri (2006), "Plantlet regeneration from leaf derived callus of Vanilla planifolia Andr", *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, **44(2)**, pp.84-89.

[12] Vũ Ngọc Long, Trần Giỏi (2013), *Khám phá tính đa dạng sinh học các loài Lan vani (Orchidaceae) trong hệ thực vật tỉnh Khánh Hòa*, www.vast.ac.vn/tin-tuc-su-kien/tin-khoa-hoc/trong-nuoc/1633-kham-pha-tinh-da-dang-sinh-hoc-cac-loai-lan-vani-orchidaceae-trong-he-thuc-vat-tinh-khanh-hoa.

[13] http://www.khuyennongtphcm.com/index.phpmnu=3&s=600012&id=1299.

[14] Vũ Thị Mỹ Liên, Nguyễn Văn Uyển và cs (1993), *Nuôi cấy mô thực vật phục vụ công tác giống cây trồng*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, TP Hồ Chí Minh, tr.103-104

[15] Vũ Ngọc Phượng, Lê Hoàn Hảo, Thái Xuân Du (2007), *Nhân giống vô tính cây Vani bằng nuôi cấy mô*, Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Sinh học nhiệt đới.

[16] Trần Thị Triêu Hà, Phan Thị Phương Nhi, Lã Thị Thu Hằng (2017), "Nghiên cứu tạo nguồn vật liệu khởi đầu in vitro cây Vanilla", *Tạp chí Khoa học và công nghệ Việt Nam*, **23(12),** tr.41-44.

[17] Nguyễn Hoàng Lộc, (2011). *Nuôi cấy mô và tế bào thực vật - Các khái niệm và ứng dụng*, Nhà xuất bản Đại học Huế, tr.28-32.