

Những biến đổi sinh lý, hóa sinh của cây Phong lan Phi điệp tím (*Dendrobium anosmum* Lindl.) trong quá trình luyện *ex vitro*

Cao Phi Bằng

Tóm tắt—Quá trình luyện *ex vitro* có ý nghĩa rất lớn đối với công nghệ vi nhân giống. Cây có nguồn gốc *in vitro* phải thích nghi rất nhanh chóng với sự thay đổi của môi trường. Công trình này có mục tiêu nghiên cứu một số biến đổi sinh lý, hóa sinh của cây Phong lan Phi điệp tím có nguồn gốc *in vitro* trong quá trình luyện *ex vitro* như các hàm lượng nước, chất khô, proline cũng như các sắc tố quang hợp (chlorophyll a, chlorophyll b và carotenoid), hiệu suất quang chlorophyll và hoạt độ của một số enzyme chống oxy hóa (peroxidase và catalase). Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng hàm lượng nước giảm xuống trong cây *ex vitro* so với cây *in vitro*. Hàm lượng chlorophyll và carotenoid trong mô lá tăng theo quá trình luyện *ex vitro*. Khi các cây được chuyển khỏi môi trường *in vitro*, hiệu suất quang hóa cực đại của quang hệ II (Fv/Fm) giảm xuống ở những thời kì luyện sớm và chỉ phục hồi ở thời kì muộn của quá trình luyện cây. Hàm lượng proline và hoạt độ các enzyme chống oxy hóa tăng lên ở các thời kì khác nhau của quá trình luyện. Giá trị cực đại của hàm lượng proline và hoạt độ các enzyme được ghi nhận ở pha *ex vitro* đầu tiên, thời kì cây bị mất nhiều nước nhất. Những kết quả nghiên cứu này gợi ý rằng cây phong lan Phi điệp tím *in vitro* đã thích nghi với sự chuyển môi trường sống bằng cách phát triển những đáp ứng sinh lí của hệ thống quang hợp cũng như bộ máy chống oxy hóa.

Từ khóa—biến đổi sinh lý, hóa lý, luyện *ex vitro*, Phong lan Phi điệp tím (*Dendrobium anosmum* Lindl.)

1. MỞ ĐẦU

Phong lan Phi điệp tím (*Dendrobium anosmum* Lindl.) thuộc họ Phong lan (Orchidaceae) giống Hoàng thảo (*Dendrobium*). Phi điệp tím có thân cây

Ngày nhận bản thảo: 12-01-2017, ngày chấp nhận đăng: 25-07-2018, ngày đăng: 10-09-2018

Tác giả: Cao Phi Bằng- Trường Đại học Hùng Vương, Phú Thọ- phibang.cao@hvu.edu.vn

thòng, lá xếp hai hàng dọc theo thân, dày, hoa đẹp, phù hợp với mục tiêu trang trí, làm cảnh, nên được trồng rộng rãi và có giá trị kinh tế cao. Ngày nay, nhu cầu của con người với loài Phong lan này ngày càng lớn nên việc nhân giống loài lan này bằng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật (*in vitro*) được thực hiện ở nhiều nơi. Một số nghiên cứu nhân giống loài lan này bằng công nghệ *in vitro* đã được báo cáo [1–3].

Trong công nghệ nhân giống *in vitro*, muốn chuyển cây con từ giai đoạn ống nghiệm ra môi trường tự nhiên cần phải trải qua quá trình luyện *ex vitro*. Trong quá trình này, cây con phải thích nghi với sự thay đổi của môi trường sống từ nhân tạo (giàu đường, có phytohormone và có độ ẩm cao) đến tự nhiên trong một thời gian ngắn. Để có thể thích nghi với môi trường mới, có thể cơ thể chúng sẽ có những biến đổi về sinh lý, hóa sinh rất đáng chú ý [4–7]. Cây thuốc lá *in vitro* khi chuyển sang điều kiện *ex vitro* hai tuần có hàm lượng chlorophyll tổng số (Chl a+b) tăng lên, từ 0,9–1,1 g/kg mẫu tươi lên 1,5–1,7 g/kg mẫu tươi, ngoài ra, hiệu quả quang hóa của quang hệ II (Fv/Fm) cũng tăng lên ở cây *ex vitro* [4]. Trong một nghiên cứu khác, động thái hàm lượng chlorophyll trong lá cây thuốc lá tuy biến đổi phụ thuộc vào hàm lượng đường trong môi trường nuôi cấy cũng như chế độ chiếu sáng ở giai đoạn trước luyện cây *ex vitro*, nhưng đều có xu hướng tăng cao ở giai đoạn cuối khi so với ở điều kiện *in vitro* [6, 8]. Tuy nhiên, trong báo cáo của Jeon và cs. (2006), hàm lượng chlorophyll trong lá cây *Doritaenopsis* hầu như không biến đổi trong quá trình luyện cây [7]. Gần đây, Jahan và Anis (2014) đã chỉ ra rằng hàm lượng chlorophyll và carotenoid trong lá cây Tam phòng (*Cardiospermum halicacabum*) giảm xuống trong những ngày đầu (bảy ngày đầu tiên) và tăng lên ở cuối thời kì luyện cây [9]. Sự thay đổi hàm lượng sắc tố quang hợp ở cây *ex vitro* so với cây *in*

vitro trong quá trình luyện thường phụ thuộc vào chế độ chiếu sáng cũng như hàm lượng đường có trong môi trường nuôi cấy [5]. Trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi trên đối tượng cây Riềng bản địa Bắc Kạn (*Alipinia* sp.), hàm lượng chlorophyll cũng như carotenoid tăng lên khi cho cây *in vitro* tiếp xúc với ánh sáng tự nhiên, và tăng mạnh ở thời kỳ cuối của quá trình luyện cây *ex vitro*. Tương tự, huỳnh quang chlorophyll cũng tăng mạnh ở hai thời kỳ luyện cây cuối [10]. Gần đây, hàm lượng sắc tố quang hợp và hiệu quả quang hóa của quang hệ II (Fv/Fm) của cây Phong lan Đại châu (*Rhynchosytilis giganteae*) thời kỳ đầu luyện cây *ex vitro* đã được bước đầu nghiên cứu [11]. Trong đó, hàm lượng chlorophyll và carotenoid của cây *ex vitro* đều cao hơn so với cây *in vitro*. Huỳnh quang chlorophyll của lá cây *ex vitro* tăng nhẹ so với cây *in vitro*.

Bên cạnh các sắc tố quang hợp, hoạt độ các enzyme chống oxy hóa cũng được quan tâm nghiên cứu trong quá trình luyện cây *ex vitro* như các peroxidase, superoxide dismutase, catalase... Các enzyme này thường liên quan đến con đường loại bỏ các gốc oxy hóa tự do cũng như H₂O₂ trong mô thực vật nên chúng giữ vai trò bảo vệ quan trọng ở thực vật chống lại các stress bất lợi của môi trường [12]. Trong quá trình luyện *ex vitro* cây Tam phong, hoạt tính superoxide dismutase tăng mạnh trong bảy ngày đầu, nhưng sau đó giảm dần ở cuối quá trình. Trong khi đó, hoạt tính catalase và ascorbate peroxidase tăng dần trong suốt quá trình luyện cây *ex vitro* [9]. Ở cây cúc đồng tiền (*Gerbera jamesonii* H. Bolus ex Hook), hoạt độ của cả bốn enzyme superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, catalase và superoxide dismutase trong mô lá nhỏ hơn ở cây đã luyện *ex vitro* so với cây *in vitro* [13]. Ngược lại, hoạt độ của cả bốn enzyme trên đều tăng ở cây Đậu đài Ấn Độ (*Tylophora indica*) trong thời kỳ luyện *ex vitro* so với cây *in vitro* [14]. Hoạt độ catalase trong lá cây Riềng Bắc Kạn không tăng ở cây *in vitro* tiếp xúc với ánh sáng tự nhiên nhưng tăng lên ở cây đã chuyển khỏi môi trường nhân tạo [10]. Ở cây Phong lan Đại châu, hoạt độ catalase tăng lên trong thời kỳ đầu luyện cây so với cây *in vitro* [11].

Nhiều đặc điểm sinh lý, hóa sinh thú vị đã được phát hiện ở một số thực vật *in vitro* trong quá trình luyện cây. Tuy nhiên, những nghiên cứu sự biến đổi này còn chưa được thực hiện ở cây Phong lan

Phi điệp tím. Nghiên cứu này có mục tiêu xác định các biến đổi về hàm lượng nước và chất khô, hàm lượng proline và các sắc tố quang hợp, huỳnh quang chlorophyll cũng như hoạt độ của các enzyme chống oxy hóa tương đối phức tạp trong quá trình luyện cây *ex vitro*. Những kết quả nghiên cứu về các động thái sinh lý, hóa sinh này có ý nghĩa lớn, cung cấp các thông tin khoa học bổ ích, đồng thời góp phần xây dựng các biện pháp kỹ thuật để luyện cây một cách có hiệu quả.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu

Cây Phong lan Phi điệp tím *in vitro* có nguồn gốc từ hạt được nuôi cấy trên môi trường Knudson [15] có bổ sung 30 g/L đường sucrose, 100 ml/L nước dừa, 100g/L khoai tây 1 g/L than hoạt tính, 6 g/L agar (hãng sản xuất Qualigens, Mumbai, India) và 0,3 mg/L NAA (α -naphthalene acetic acid) (Merck, Đức), có 3-4 lá và tối thiểu 3 rễ được sử dụng cho quá trình luyện *ex vitro*. Thí nghiệm gồm 30 bình cây, mỗi bình có ba cây. Các bình cây được đặt trong phòng nuôi cấy với điều kiện nhiệt độ 25°C/22°C (ngày/đêm), chu kỳ 12 h sáng/12 h tối, chiếu sáng với đèn Neon (hãng Rạng Đông, Việt Nam), cường độ ánh sáng khoảng 1920-1990 lux. Quá trình luyện *ex vitro* : (1) Bình chứa cây được cho tiếp xúc với ánh sáng tự nhiên (cường độ ánh sáng dao động trong khoảng 350-900 lux) 7 ngày. (2) Sau đó agar được loại bỏ nhẹ nhàng và cây đã loại bỏ agar được ngâm 5 phút trong dung dịch KMnO₄ 0,1%, đặt trên bề mặt giá có khay chứa nước phía dưới trong thời gian 5 ngày, phun sương 2 lần/ngày. (3) Tiếp theo, cây được trồng trong chậu nhựa có giá thể là hỗn hợp rêu khô:dớn (tỉ lệ 1:1), đặt trong nhà lưới tại Trung tâm Nghiên cứu Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Hùng Vương với điều kiện chiếu sáng tự nhiên, phun sương 2 ngày/lần. Các mẫu lá được thu vào các thời điểm ngày đầu tiên (D0) chuyển ra tiếp xúc với ánh sáng tự nhiên, ngày thứ 7 chuyển ra khay (D7), ngày thứ 12 (D12), cây bắt đầu đặt vào chậu chứa giá thể và ngày 28 (D28), 56 (D56) tính từ thời điểm D0.

Phương pháp nghiên cứu

Huỳnh quang chlorophyll được đo trực tiếp từ lá của ít nhất năm cây khác nhau, mỗi cây đo ít nhất một lá bằng máy OS30p+ (OPTI-SCIENES, Mỹ).

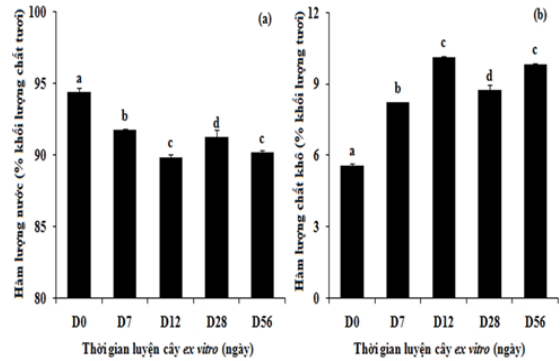
Lá của ít nhất ba cây khác nhau (một lá/cây) được thu để thực hiện các phân tích hóa sinh. Hàm lượng chlorophyll và carotenoid được tách bằng dung dịch acetone 80%, quang phổ hấp phụ của dịch chiết được đo ở các bước sóng 663,2 nm, 646,8 nm và 470 nm bằng máy quang phổ hấp phụ UV-VIS GENESYS 10uv (Thermo Electron Corporation, Mỹ) theo phương pháp được mô tả bởi Nguyễn Văn Mã et al. [16]. Hoạt độ enzyme catalase được xác định bằng phương pháp chuẩn độ được mô tả bởi Nguyễn Văn Mã và cs. [16]. Hàm lượng nước và hàm lượng chất khô được xác định bằng cách cân khối lượng tươi (KLT) với cân kỹ thuật (PioneerTM, Ohaus Corp., Mỹ), sau đó cây được sấy khô ở 80°C trong 48 h đến khối lượng không đổi, cân khối lượng khô (KLK). Hàm lượng nước và chất khô là tỉ lệ % của nước và % chất khô của khối lượng tươi [16].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hàm lượng nước, chất khô

Cây *in vitro* phải thích nghi rất nhanh với các điều kiện mới của môi trường ngoại cảnh trong quá trình luyện cây *ex vitro*. Độ ẩm không khí là một trong những điều kiện sống thay đổi rõ nét nhất, thường ở mức gần bão hòa hoặc bão hòa trong môi trường *in vitro* giảm xuống khoảng 70-80% ở không khí bên ngoài. Trong một số nghiên cứu trước đây đã chỉ ra có sự giảm hàm lượng nước trong mô cây Táo (*Malus pumila* cv. Greensleaves) [17] hoặc cây Riềng (*Alpinia* sp.) [10] *ex vitro* so với cây *in vitro*.

Hàm lượng nước trong cây Phong lan Phi điệp tím cao nhất ở thời điểm D0, khi cây được giữ trong bình thủy tinh chứa môi trường dinh dưỡng nhân tạo, đạt 94,42% KLT). Hàm lượng nước giảm xuống khi cây được tiếp xúc với ánh sáng tự nhiên (D7), chỉ còn 91,77% KLT. Hàm lượng nước giảm xuống thấp nhất ở thời điểm D12 (89,86% KLT). Hàm lượng nước tăng lên ở thời điểm D28 (91,26% KLT) nhưng lại giảm ở thời điểm D56 (90,18% KLT). Hàm lượng chất khô của cây Phong lan phi điệp tím trong các thời điểm nghiên cứu biến đổi ngược với hàm lượng nước. Giá trị hàm lượng chất khô thấp nhất ở thời điểm D0 (5,58% KLT), cao nhất ở thời điểm D12 (10,14% KLT) và D56 (9,82% KLT) (Hình 1).

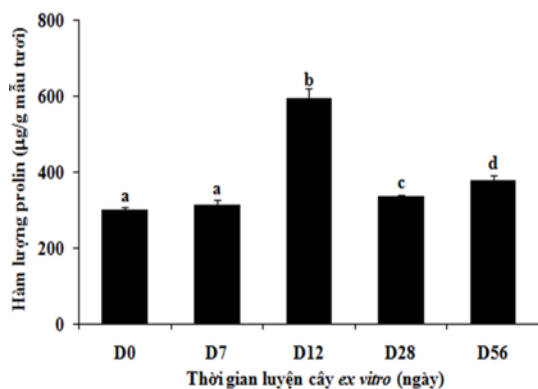


Hình 1. Hàm lượng nước và hàm lượng chất khô của cây Phong lan Phi điệp tím trong quá trình luyện *ex vitro*. D = ngày (day). Thanh sai số thể hiện giá trị độ lệch chuẩn. Các thanh sai số được đánh dấu cùng chữ cái không khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p=0,05$) khi kiểm định với phép kiểm tra Duncan.

Sự biến đổi hàm lượng nước và hàm lượng chất khô trong cây lan Phi điệp tím ở thời kỳ luyện *ex vitro* có thể do sự thay đổi về độ ẩm của môi trường sống. Trong những thời kỳ đầu, khi độ ẩm môi trường giảm xuống đột ngột, cây mất nước dẫn tới tỉ lệ nước so với khối lượng tươi giảm, đồng thời hàm lượng chất khô tăng lên. Ngoài ra, một nguyên nhân khác làm hàm lượng nước giảm, hàm lượng chất khô tăng là do hoạt động quang hợp của cây mạnh hơn dưới điều kiện ánh sáng tự nhiên. Thực vậy, hoạt động quang hợp mạnh hơn ở cây *ex vitro* so với ở cây *in vitro* đã được quan sát ở một số thực vật như Cọ dầu (*Elaeis guineensis* Jacq.) [18]. Các kết quả nghiên cứu của chúng tôi xác định những nghiên cứu khác về hàm lượng nước trong cây Táo [17], cây Riềng [10] hoặc và cây Phong lan Đại châu [11] *in vitro* trong quá trình ra ngôi.

Hàm lượng proline

Proline là một amino acid ưa nước, thuộc nhóm amino acid tự do, có khả năng hòa tan mạnh trong nước và tạo áp suất thẩm thấu cho tế bào. Proline được tích lũy trong cơ thể thực vật trong điều kiện sinh lý bình thường và khi bị stress. Từ lâu, amino acid này được chứng minh có rất nhiều vai trò trong sự phát triển cũng như tính chống chịu của thực vật, đặc biệt khi môi trường sống thay đổi [19, 20].



Hình 2. Hàm lượng proline của cây Phong lan phi điệp tím trong quá trình luyện ex vitro. D = ngày (day). Thanh sai số thể hiện giá trị độ lệch chuẩn. Các thanh sai số được đánh dấu cùng chữ cái không khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p=0,05$) khi kiểm định với phép kiểm tra Duncan.

Kết quả phân tích hàm lượng proline trong mô lá của cây Phong lan Phi điệp tím ở các giai đoạn của quá trình ra ngôi (Hình 2) cho thấy rằng hàm lượng proline trong lá tương đối cao ở cây *in vitro*, lần lượt đạt 311,18 µg/g ở D0 và 310,65 µg/g ở D7. Hàm lượng của amino acid này tăng cao hơn ở các thời kì luyện cây, cao nhất ở thời điểm D12 (596,48 µg/g lá tươi). Ở hai thời điểm D28 và D56, hàm lượng proline trong cây lan phi điệp tím thấp hơn so với ở thời điểm D12 nhưng cao hơn hai thời điểm D0 và D7. Có thể khi chuyển cây ra môi

Bảng 1. Hàm lượng sắc tố quang hợp trong mô lá Phong lan Phi điệp tím trong quá trình luyện ex vitro

Giai đoạn	Chla			Chlb			Chla+b			Carotenoid			Chla/Chlb		
	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD
D0	0,159 ^a	±	0,001	0,087 ^a	±	0,006	0,246 ^a	±	0,005	0,025 ^a	±	0,004	1,84 ^a	±	0,14
D7	0,342 ^b	±	0,057	0,199 ^b	±	0,038	0,542 ^b	±	0,095	0,058 ^b	±	0,012	1,73 ^a	±	0,09
D12	0,513 ^c	±	0,029	0,298 ^c	±	0,010	0,813 ^c	±	0,039	0,093 ^c	±	0,009	1,72 ^a	±	0,04
D28	0,610 ^d	±	0,067	0,353 ^c	±	0,046	0,966 ^c	±	0,113	0,117 ^d	±	0,014	1,73 ^a	±	0,04
D56	0,733 ^e	±	0,057	0,480 ^d	±	0,093	1,217 ^d	±	0,151	0,125 ^d	±	0,010	1,55 ^b	±	0,16

Chla = chlorophyll a, Chlb = chlorophyll b, Car = các carotenoid, D = ngày (day)). Thanh sai số thể hiện giá trị độ lệch chuẩn. So sánh trong cùng một loại sắc tố các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p=0,05$) khi kiểm định với phép kiểm tra Duncan.

Hàm lượng diệp lục trong lá cây lan Phi điệp tím ở các thời điểm D7; D12; D28 và D56 đều cao hơn so với cây *in vitro* ở thời điểm D0, Ngay sau khi cây được tiếp xúc với ánh sáng tự nhiên 7 ngày, hàm lượng chlorophyll a trong mô lá đã cao hơn 2,15 lần khi so với cây trong phòng nuôi cây *in vitro*. Sự tăng hàm lượng chlorophyll a tiếp tục được quan sát khi cây được đưa ra khỏi bình thủy tinh, loại bỏ sự tiếp xúc với môi trường dinh

trường tự nhiên, sự mất nước đã kích hoạt cơ chế tự vệ bằng cách tăng sinh tổng hợp proline giống như ở nhiều loài thực vật đã biết khác khi bị đặt trong điều kiện hạn [19, 20]. Rất gần đây, trong nghiên cứu về quá trình luyện cây *Pitcairnia encholirioides* (họ Dứa, Bromeliaceae) của Resende và cs. (2016), hàm lượng proline trong lá cây *ex vitro* (180 ngày sau khi luyện cây) cao hơn so với cây *in vitro* (150 ngày trong ống nghiệm (không đóng nắp) chứa môi trường dinh dưỡng nhân tạo có bổ sung GA3 (Gibberellic acid). Tuy nhiên, ở loài này, trong điều kiện ống nghiệm được đóng nắp, hàm lượng proline hầu như không thay đổi giữa cây *ex vitro* so với cây *in vitro*. Cũng trong cùng nghiên cứu, nếu môi trường dinh dưỡng nhân tạo có bổ sung NAA thì hàm lượng proline trong lá cây *in vitro* lại cao hơn so với trong lá cây *ex vitro* [21]

Hàm lượng sắc tố quang hợp

Các sắc tố quang hợp được tổ chức thành các phức hệ quang hợp gắn trên màng thylakoid trong lục lạp của tế bào thực vật, gồm các phân tử chlorophyll a (Chla), chlorophyll b (Chlb) và các carotenoid. Quá trình luyện cây đã ảnh hưởng tới hàm lượng các sắc tố quang hợp trong mô lá của cây Phong lan Phi điệp tím (Bảng 1).

dưỡng nhân tạo ở các thời điểm D12; D28 và D56, lần lượt bằng 3,22; 3,84 và 4,61 lần so với ở thời điểm D0. Hàm lượng chlorophyll b trong mô lá của cây *in vitro* cũng thấp hơn ở cây *ex vitro*. Tương tự như chlorophyll a, hàm lượng Chlb trong mô lá của cây Phong lan phi điệp tím tăng ngay khi cây được tiếp xúc với ánh sáng tự nhiên và tăng mạnh khi cây được đưa ra khỏi môi trường nhân tạo. So với thời điểm D0, nồng độ

chlorophyll trong mô lá cây lan Phi điệp tím ở các thời điểm D7; D12; D28 và D56 tăng lần lượt 2,29; 3,43; 4,06 và 5,52 lần. Sự tăng hàm lượng chlorophyll a và chlorophyll b của lá cây lan Phi điệp tím trong quá trình luyện cây kéo theo sự tăng hàm lượng chlorophyll tổng số (Chla+b). Sự biến đổi hàm lượng chlorophyll tổng số (a+b) của lá trong quá trình luyện cây có cùng chiều hướng với sự biến đổi hàm lượng chlorophyll b. Khi so với ở thời điểm D0, hàm lượng chlorophyll tổng số trong lá cây lan Phi điệp tím ở các thời điểm D7, D12, D28 và D56 lần lượt tăng 2,20; 3,30; 3,93 và 4,95 lần. Trong nghiên cứu này, mức độ tăng hàm lượng chlorophyll b cao hơn so với hàm lượng chlorophyll a, dẫn tới sự thay đổi tỉ lệ Chla/Chlb. So với cây *in vitro*, cây ở thời kì cuối của quá trình luyện *ex vitro* có tỉ lệ Chla/Chlb thấp hơn.

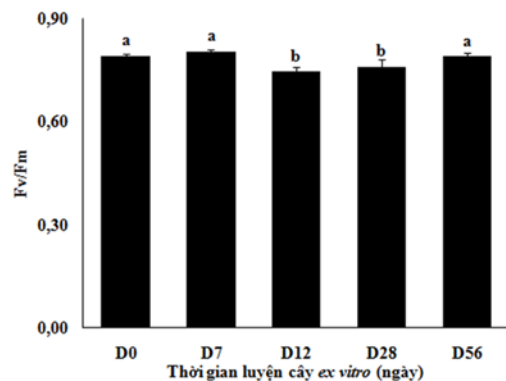
Tương tự, hàm lượng carotenoid trong lá cây cũng có xu hướng tăng khi luyện cây Phi điệp tím có nguồn gốc *in vitro*. Hàm lượng carotenoid trong lá tăng nhanh ở các thời kì luyện cây cuối. Ở các thời điểm D7, D12, D28 và D56, hàm lượng carotenoid trong lá cây tăng lần lượt 2,32 ; 3,72 ; 4,68 và 5,00 lần so với ở thời điểm D0.

Như vậy, khi cho cây tiếp xúc với ánh sáng tự nhiên, hàm lượng các sắc tố quang hợp có xu hướng tăng lên so với cây được đặt trong phòng nuôi cây *in vitro*, với nguồn sáng nhân tạo (đèn Neon, Rạng Đông, cường độ ánh sáng trong khoảng 1929–1998 lux), dù rằng cường độ ánh sáng tự nhiên thấp hơn, dao động trong khoảng 350–900 lux. Những kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nhiều báo cáo đã công bố của các tác giả khác như Donnelly và Vidaver (1984) [22], Rival và cs., (1997) [18] Pospíšilová và cs., (1998, 2007) [4, 5], Kadleček và cs., (2001) [6], Jahan và Anis (2014) [9], Dương và Bằng (2016) [10], Bằng và cs. (2016) [11]. Tuy nhiên, động thái biến đổi của sắc tố quang hợp có một vài khác biệt nhỏ ở một số thời điểm nghiên cứu của quá trình luyện cây *ex vitro*. Ở thời điểm cây mới được đưa ra khỏi bình nuôi cây *in vitro*, hàm lượng sắc tố quang hợp suy giảm nhẹ sau đó mới dần phục hồi khi cây đã quen với môi trường *ex vitro* như ở cây Tam phong [9], cây Húng quế (*Ocimum basilicum* L.) [23]. Trong khi đó, hàm lượng chlorophyll trong mô lá của cây *Doritaenopsis* hầu như không biến đổi trong quá trình luyện *ex vitro* [7]. Ở cây Riêng Bắc Kạn, hàm lượng sắc tố quang hợp tăng nhẹ khi

cây *in vitro* được tiếp xúc với ánh sáng tự nhiên nhưng lại giảm xuống mức ban đầu khi cây được chuyển ra khỏi môi trường dinh dưỡng nhân tạo [10]. Hoặc ở cây Phong lan Đại châu, hàm lượng các sắc tố quang hợp hầu như không tăng khi chuyển cây tiếp xúc với ánh sáng tự nhiên [11].

Huỳnh quang chlorophyll

Hoạt tính của quang hệ II được phản ánh bởi huỳnh quang chlorophyll và phép đo huỳnh quang chlorophyll là một kĩ thuật thông dụng trong sinh lí thực vật. Sự nhạy cảm của hoạt tính quang hệ II là một chỉ số cho biết thực vật đáp ứng như thế nào với sự thay đổi môi trường [24]. Trong các chỉ số huỳnh quang chlorophyll, chỉ số hiệu suất quang hóa của quang hệ II (Fv/Fm) liên quan đến năng suất lượng tử quang hợp. Chỉ số này thường giảm thấp hơn ở lá cây khi bị đặt trong các điều kiện bất lợi của môi trường như nhiệt độ thấp, nhiệt độ cao, hạn, mặn... do chúng gây ra những tổn thương hoặc bất hoạt quang hệ II [25]. Sự biến động về hiệu suất quang hóa của quang hệ II của cây Phong lan Phi điệp tím trong quá trình luyện cây *ex vitro* đã được phân tích, kết quả được trình bày trong Hình 3.



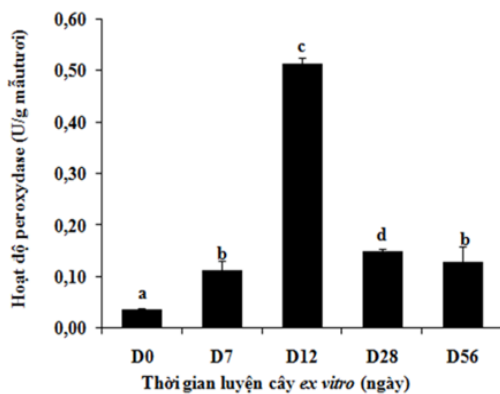
Hình 3. Huỳnh quang chlorophyll của lá cây Phong lan Phi điệp tím trong quá trình luyện *ex vitro*. D = ngày (day). Thanh sai thể hiện giá trị độ lệch chuẩn. Các thanh sai số được đánh dấu cùng chữ cái không khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p=0,05$) khi kiểm định với phép kiểm tra Duncan.

Chỉ số Fv/Fm tương đối cao khi cây Phong lan Phi điệp tím còn ở trong bình nuôi cây *in vitro* (đạt giá trị 0,792 ở D0 và 0,805 ở D7). Chỉ số Fv/Fm cao có thể do cây được cung cấp đầy đủ nước. Chỉ số này giảm xuống ở thời điểm D12 (đạt 0,746) và D28 (bằng 0,760). Đến thời điểm D56, chỉ số Fv/Fm của lá Phi điệp tím *ex vitro* lại tăng lên, bằng với ở các thời điểm D0 và D7. Sự giảm chỉ số

Fv/Fm ở thời kì đầu cây được đưa ra khỏi bình thủy tinh có thể do lá bị mất nước nhanh, cây chưa kịp thích nghi với môi trường *ex vitro*. Sự biến động chỉ số Fv/Fm của lá cây Phong lan Phi điệp tím trong quá trình luyện *ex vitro* khẳng định kết quả nghiên cứu đã được báo cáo ở cây thuốc lá [8], cây khoai lang được trồng vào môi trường nhân tạo có bổ sung 40g sucrose/L môi trường [26] hay cây *Doritaenopsis* khi được đặt ở điều kiện độ ẩm không khí dưới 70% hoặc nhiệt độ môi trường bằng 15°C, 20°C hoặc 35°C [7]. Nhưng trong một số nghiên cứu khác, chỉ số Fv/Fm lại tăng cao hơn ở cây *ex vitro* so với ở cây *in vitro* trong những thời kì đầu của quá trình luyện như ở cây thuốc lá có xử lí abaeisic acid [4], cây *Doritaenopsis* khi được đặt trong điều kiện độ ẩm không khí 90% và nhiệt độ khoảng 25–30°C [7]. Các nghiên cứu gần đây trên cây Riêng và cây Phong lan Đại châu cũng cho thấy chỉ số Fv/Fm tương đối thấp ở cây trong bình *in vitro* và tăng lên khi cây được cho ra ngoài môi trường *ex vitro* [10, 11].

Hoạt độ peroxidase

Các peroxidase luôn tồn tại trong các cơ thể thực vật có mạch và liên quan đến rất nhiều các quá trình sinh lý như sự phát triển vách tế bào, chữa lành vết thương, các cơ chế chống tác nhân gây bệnh và loại bỏ H₂O₂ hình thành trong dịch bào cũng như lục lạp, chống độc tính của kim loại nặng cũng như các gốc oxy tự do hình thành từ các stress oxy hóa hay trao đổi chất tế bào [26]. Hoạt tính của enzyme này thường tăng lên khi cây bị tác động bởi các stress sinh học và phi sinh học [27].



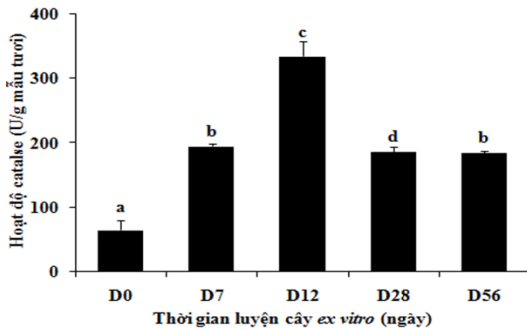
Hình 4. Hoạt độ peroxidase của mô lá cây Phong lan Phi điệp tím trong quá trình luyện *ex vitro*. Thanh sai số thể hiện giá trị độ lệch chuẩn. Các thanh sai số được đánh dấu cùng chữ cái không khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p=0,05$) khi kiểm định với phép kiểm tra Duncan.

Hoạt độ peroxidase của mô lá cây Phong lan Phi điệp tím trong quá trình luyện cây đã được phân tích (Hình 4). Trong quá trình luyện *ex vitro*, hoạt độ peroxidase trong mô lá ở tất cả các thời điểm D7; D12; D28 và D56 đều cao hơn so với ở thời điểm D0. Ngay sau khi được tiếp xúc với ánh sáng tự nhiên (D7), hoạt độ peroxidase đã tăng lên 3,05 lần so với ở D0. Hoạt độ enzyme này tăng cao nhất ở thời điểm D12, cao hơn ở D0 13,93 lần. Ở các thời kì muộn của quá trình luyện cây *ex vitro*, D28 và D56, hoạt độ peroxidase trong mô lá cây lan Phi điệp tím giảm so với ở D12 nhưng vẫn cao hơn ở thời điểm D0 lần lượt 4,06 và 3,52 lần. Sự biến động hoạt độ peroxidase liên quan đến hàm lượng nước cũng như sự thích nghi với điều kiện môi trường mới của cây Phong lan Phi điệp tím có nguồn gốc *in vitro*. Thực vậy, ở thời điểm D12, cây bị mất nước nhiều nhất, trong các tế bào có thể sản sinh nhiều gốc tự do có các gốc oxy tự do, cảm ứng sự sinh tổng hợp các protein peroxidase như một cơ chế thích nghi. Ở các thời điểm muộn hơn, cây đã bắt đầu thích nghi dần với môi trường *ex vitro*, hàm lượng nước trong lá dần trở lại trạng thái bình thường nên hoạt độ peroxidase giảm xuống. Đến thời điểm D56, hoạt độ enzyme này đã giảm xuống bằng với ở thời điểm D7 là thời điểm cây vẫn còn trong bình *in vitro*, có hàm lượng nước trong mô tương đối cao.

Động thái hoạt độ peroxidase ở mô lá của cây Phi điệp tím trong quá trình luyện cây hoàn toàn khác với của cây Cúc đồng tiền [13]. Ở cây này, không chỉ hoạt độ peroxidase (dạng ascorbate peroxidase) mà hoạt độ của các enzyme chống oxy hóa khác như catalase, superoxide dismutase và glutathione reductase đều cao ở cây *in vitro*, sau đó giảm xuống khi cây được chuyển ra khỏi môi trường *in vitro*. Trong khi đó, ở các cây Tam phòng [9] hay cây Đầu đài Ấn Độ [14], hoạt độ peroxidase của cây *in vitro* thấp hơn so với ở cây *ex vitro* trong quá trình luyện.

Hoạt độ catalase

Trong số các enzyme chống oxy hóa, catalase giúp cây loại bỏ độc tố gây ra bởi H₂O₂, hợp chất vốn sinh ra thường xuyên trong quá trình quang hợp hoặc bởi các stress của môi trường bằng cách xúc tác phân giải trực tiếp H₂O₂ thành H₂O và O₂, [12]. Ở cây Phong lan phi điệp tím, hoạt độ catalase biến động cùng chiều với hoạt độ peroxidase trong quá trình luyện *ex vitro*.



Hình 5. Hoạt độ catalase của mô lá cây Phong lan Phi điệp tím trong quá trình luyện ex vitro. Thanh sai số thể hiện giá trị độ lệch chuẩn. Các thanh sai số được đánh dấu cùng chữ cái không khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p=0,05$) khi kiểm định với phép kiểm tra Duncan.

Hoạt độ catalase thấp ở thời điểm D0, tăng khi cây được chuyển ra môi trường ex vitro, nhưng có xu hướng giảm vào cuối thời kì luyện ex vitro (Hình 5). Sự tăng sớm hoạt độ catalase có thể liên quan tới sự tăng sinh các peroxisomes, nơi khu trú của các phân tử enzyme và cần thiết cho sự phân giải H_2O_2 được tạo ra trong tuần thích nghi đầu tiên với môi trường khi cây bị stress nhẹ hoặc do hiện tượng quang ức chế gây ra [29]. Sự biến động hoạt độ catalase của cây Phong lan Phi điệp tím trong thời kì đầu quá trình luyện ex vitro giống với ở cây Đâu đài Ấn Độ [14] hoặc cây Tam phồng [9] nhưng khác với ở cây Cúc đồng tiền [13].

Có vẻ như cây Phong lan Phi điệp tím nguồn gốc in vitro có những phản ứng thích nghi với môi trường ex vitro. Những kết quả trong nghiên cứu này chỉ ra cây Phong lan Phi điệp tím in vitro đã phát triển bộ máy quang hợp song song với các phản ứng sinh lý giúp giảm tác động của stress oxy hóa trong quá trình luyện cây.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, các biến đổi của hàm lượng nước, chất khô, proline và các sắc tố quang hợp (chlorophyll và carotenoid) của cây Phong lan Phi điệp tím trong quá trình luyện cây ex vitro đã được phân tích. Bên cạnh đó động thái huỳnh quang chlorophyll và hoạt độ các enzyme peroxidase và catalase cũng được quan sát. Cây phong lan Phi điệp tím khi được chuyển khỏi môi trường in vitro có xu hướng tăng hàm lượng chất khô, hàm lượng các sắc tố quang hợp cũng như hàm lượng proline và hoạt độ các enzyme chống oxy hóa. Hiệu suất quang hóa của quang hệ II giảm trong thời kì cây Phong lan Phi điệp tím mới

được chuyển ra khỏi bình thủy tinh, khi cây mất nhiều nước và tăng trở lại vào cuối của quá trình luyện cây. Những biến đổi sinh lý này của cây Phong lan Phi điệp tím có nguồn gốc nuôi cấy mô trong quá trình luyện ex vitro nhằm phát triển bộ máy quang hợp cũng như tăng khả năng chống chịu stress oxy hóa.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí từ chương trình nghiên cứu khoa học cơ bản của Trường Đại học Hùng Vương, tỉnh Phú Thọ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. P.Y.A. Dewi, E. Kriswiyanti, I.A. Astarini, Embryo rescue *Dendrobium anosmum* Lindl. using in vitro culture Embryo rescue *Dendrobium anosmum* Lindl. using in vitro culture, (in Indonesian), *Metamorfosa*, 3, 2, 129–139, 2016.
- [2]. S. Tuhuteru, M.L. Hehanussa, S.H.T. Raharjo, Growth and development of *Dendrobium anosmum* orchid on in vitro culture media with several coconut water concentrations Growth and development of *Dendrobium anosmum* orchid on in vitro culture media with several coconut water concentrations, (in Indonesian), *Agrologia*, 1, 1, 1–12, 2012.
- [3]. N.V. Vinh, N.H. Lê, Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự phát sinh chồi và rễ phong lan Giả hạt *Dendrobium anosmum*, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 47, 5, 99–107, 2009.
- [4]. J. Pospíšilová N. Wilhelmová, H. Synková, J. Čatský, D. Krebs, I. Tichá, B. Hanáčková and J. Snopek, Acclimation of tobacco plantlets to ex vitro conditions as affected by application of abscisic acid, *Journal of Experimental Botany*, 49, 322, 863–869, 1998.
- [5]. J. Pospíšilová, H. Synková, D. Haisel, S. Semoradova, Acclimation of Plantlets to Ex vitro Conditions: Effects of Air Humidity, Irradiance, CO₂ Concentration and Abscisic Acid (a Review), *Acta Horticulturae*, 748, 29, 2007.
- [6]. P. Kadleček, I. Tichá, D. Haisel, V. Čapková, C. Schäfer, Importance of in vitro pretreatment for ex vitro acclimatization and growth, *Plant Science*, 161, 4, 695–701, 2001.
- [7]. M.W. Jeon, M.B. Ali, E.J. Hahn, K.Y. Paek, Photosynthetic pigments, morphology and leaf gas exchange during ex vitro acclimatization of micropropagated CAM *Doritaenopsis* plantlets under relative humidity and air temperature, *Environmental and Experimental Botany*, 55, 1–2, 183–194, 2006.
- [8]. P. Hofman, D. Haisel, J. Komenda, M. Vágner, I. Tichá, C. Schäfer and V. Čapková, Impact of in vitro Cultivation conditions on stress responses and on changes in thylakoid membrane proteins and pigments of tobacco

- during *ex vitro* acclimation., *Biologia Plantarum*, 45, 2, 189–195, 2002.
- [9]. A.A. Jahan, M. Anis, Changes in antioxidative enzymatic responses during acclimatization of *in vitro* raised plantlets of *Cardiospermum halicacabum* L. against oxidative stress, *J. Plant. Physiol Pathol.*, 4, 2, 2014.
- [10]. V.X. Duong, C.P. Bằng, Biến đổi sinh lý, hóa sinh của cây riềng bản địa Bắc Kạn (*Alpinia sp.*) *in vitro* trong thời kì ra ngôi *ex vitro*, Hội nghị khoa học Quốc gia lần thứ 2 về Nghiên cứu và giảng dạy Sinh học ở Việt Nam, Đà Nẵng, Việt Nam, 2016.
- [11]. C.P. Bằng, T.T.T. Huyền, T.T.T. Phương, Biến động hàm lượng sắc tố quang hợp, huỳnh quang chlorophyll và hoạt độ catalase của cây Phong lan đại châu (*Rhynchosytilis gigantea*) trong thời kì luyện *ex vitro* Biến động hàm lượng sắc tố quang hợp, huỳnh quang chlorophyll và hoạt độ catalase của cây Phong lan đại châu (*Rhynchosytilis gigantea*) trong thời kì luyện *ex vitro*, Hội nghị khoa học Quốc gia lần thứ 2 về Nghiên cứu và giảng dạy Sinh học ở Việt Nam, Đà Nẵng, Việt Nam, 2016.
- [12]. R.K. Sairam, P.S. Deshmukh, D.C. Saxena, Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress, *Biologia Plantarum*, 41, 3, 387–394, 1998.
- [13]. D. Chakrabarty, S.K. Datta, Micropropagation of gerbera: lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities during acclimatization process, *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 3, 325–331, 2008.
- [14]. M. Faisal, M. Anis, Effect of light irradiations on photosynthetic machinery and antioxidative enzymes during *ex vitro* acclimatization of *Tylophora indica* plantlets, *Journal of Plant Interactions*, 5, 1, 21–27, 2010.
- [15]. L. Knudson, A new nutrient solution for germination of orchid seeds. *Am. Orc. Soc. Bull.*, 15:214–217, 1946.
- [16]. N.V. Mã, L.V. Hồng, Ô.X. Phong, *Phương pháp nghiên cứu Sinh lý học thực vật*. Hà Nội: NXB Đại học Quốc gia Hà Nội, 2013.
- [17]. J.C. Díaz-Pérez, E.G. Sutter, K.A. Shackel, Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil, *Physiologia Plantarum*, 95, 2, 225–232, 1995.
- [18]. A. Rival, T. Beulé, D. Lavergne, A. Nato, M. Havaux, M. Puard, Development of photosynthetic characteristics in oil palm during *in vitro* micropropagation, *Journal of Plant Physiology*, 150, 5, 520–527, 1997.
- [19]. L. Szabados, A. Savoure, Proline: a multifunctional amino acid, *Trends Plant Sci*, 15, 2, 89-97, 2010.
- [20]. S. Hayat, Q. Hayat, M.N. Alyemeni, A.S. Wani, J. Pichtel, A. Ahmad, Role of proline under changing environments: a review, *Plant Signal Behav*, 7, 11, 1456–66, 2012.
- [21]. C.F. Resende, V. F. Braga, P.F. Pereira, C. J. Silva, V.F. Vale, R.E. Bianchetti, R. C. Forzza, C. Ribeiro, and P.H.P. Peixoto, Proline levels, oxidative metabolism and photosynthetic pigments during *in vitro* growth and acclimatization of *Pitcairnia encholirioides* L.B. Sm. (Bromeliaceae), *Braz. J. Biol.*, 76, 1, 218–27, 2016.
- [22]. D.J. Donnelly, W.E. Vidaver, Pigment content and gas exchange of red raspberry *in vitro* and *ex vitro*, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 109, 2, 177–181, 1984.
- [23]. I. Siddique, M. Anis, An improved plant regeneration system and *ex vitro* acclimatization of *Ocimum basilicum* L., *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 4, 493–499, 2008.
- [24]. E.H. Murchi, T. Lawson, Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications, *J.Exp. Bot.*, 64, 13, 3983–98, 2013.
- [25]. S.P. Long, S. Humphries, P.G. Falkowski, Photoinhibition of Photosynthesis in Nature, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45, 1, 633–662, 1994.
- [26]. Cassana, A.R. Falqueto, E.J.B. Braga, J.A. Peters, M.A. Bacarin, Chlorophyll a fluorescence of sweet potato plants cultivated *in vitro* and during *ex vitro* acclimatization, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2010.
- [27]. U. Kalsoom, H.N. Bhatti, M. Asgher, Characterization of Plant Peroxidases and Their Potential for Degradation of Dyes: a Review, *Appl Biochem Biotechnol*, 176, 6, 1529–50, 2015
- [28]. J. Shigeto, Y. Tsutsumi, Diverse functions and reactions of class III peroxidases, *New Phytol*, 209, 4, 1395–402, 2016.
- [29]. S.K. Kessel-Vigelius, J. Wiese, M. G. Schroers, T.J. Wrobel, F. Hahn, N. Linka, An engineered plant peroxisome and its application in biotechnology, *Plant Science*, 210, 232–240, 2013.

Physiological and biochemical changes of micropropagated *Dendrobium anosmum* Lindl. in *ex vitro* acclimatization process

Cao Phi Bang

Hung Vuong University

Corresponding author: phibang.cao@hvu.edu.vn

Received: 12-01-2017, accepted: 25-07-2018, published: 10-09-2018

Abstract—The *ex vitro* acclimatization process plays an important role in plant micropropagation. *In vitro* plantlets have to rapidly adapt to environmental changes. The current work aimed at assessing some physiological and biochemical changes of micropropagated *Dendrobium anosmum* Lindl. Plantlets during *ex vitro* acclimatization process, eg. contents of water (leaf relative water content), dry matter, proline and photosynthetic pigments (chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoid), chlorophyll fluorescence and antioxidant enzymes (peroxidase và catalase) activities. The analyzed results showed that water content decreased in acclimatized plantlets compared to *in vitro* ones. The chlorophylls and carotenoids contents of what were significantly higher in *ex vitro* plantlet leaves compared to the day 0 plantlets. The pigment contents were observed to increase during the *ex vitro* acclimatization process. When the plantlets were

moved out of the *in vitro* medium, the maximum photochemical efficiency of photosystem II (Fv/Fm) significantly decreased at the early acclimatization points then restored at the end of acclimatization process. The content of proline and activities of antioxidant enzymes significantly increased with different periods of acclimatization process. The proline content and enzyme activities were recorded at the first *ex vitro* period when most water loss occurred in plantlets. These results suggest that *Dendrobium anosmum* Lindl *in vitro* plantlets have adapted to the transplantation by possessing some physiological responses of its photosynthetic system as well as its antioxidant machinery.

Index Term—physic- bio chemical change, *ex vitro* acclimatization, peroxidase activity, photosynthetic pigments, proline, *Dendrobium anosmum* Lindl.