

SỰ HÌNH THÀNH MÔ SẼO PHÁT SINH PHÔI SINH DƯỠNG VÀ CÂY CON TỪ NUÔI CẤY ĐỈNH SINH TRƯỞNG GIỐNG ĐỊA LAN LAI VÀNG HOÀNG HẬU (*CYMBIDIUM* HYBRID “FX750”)

Trần Thị Ngọc Lan*, Trần Thị Hoàn Anh**

TÓM TẮT

Title: Embryogenic callus formation and plant regeneration from apical meristem culture of cymbidium hybrid FX750 orchid

Từ khóa: Casein thủy phân, địa lan, mô phân sinh ngọn chồi, mô sẹo, PLB

Keywords: Apical meristem, callus, casein hydrolysate, Cymbidium, PLB.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/2/2017;

Ngày nhận kết quả bình duyệt: 19/3/2017;

Ngày chấp nhận đăng bài: 06/9/2017.

Tác giả:

*TS., **CN., trường Cao đẳng Kinh tế Kỹ thuật Lâm đồng

tranngoclan_dl@yahoo.com.vn

Mô sẹo hình thành từ nuôi cấy chồi đỉnh, giống địa lan FX750 trên môi trường MS bổ sung 0,2mg/l α -NAA, 2 mg/l BA, 10% nước dừa (CW), 30g/l sucrose, 1g/l than hoạt tính (AC), 8g/l agar với tỷ lệ đạt 46,67% và được nhân nhanh trên môi trường tương tự, bổ sung 0,5g/l casein thủy phân (tỷ lệ tăng trưởng: 10,87 lần). Mô sẹo biệt hóa thành PLB trên môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật, tái sinh thành cây khi chúng được chuyển sang môi trường MS bổ sung 0,5mg/l α -NAA, 0,5mg/l BA, 10% CW, 30g/l sucrose, 1g/l AC, 8g/l agar. Quan sát giải phẫu cho thấy mô sẹo có khả năng phát sinh phôi. Sau 6 tháng trồng cây trong nhà kính, 100% cây thích nghi tốt trong tự nhiên, không có các sai hình nào được ghi nhận từ những cây này.

ABSTRACT

Embryogenic calli were formed from apical meristem culture of Cymbidium FX750 on MS medium containing 0.2 mg/l α -NAA, 2 mg/l BA, 10% coconut water (CW), 30 g/l sucrose, 1 g/l AC, 8 g/l agar with the callus formation rate of 46.67%. These calli were proliferated on the same medium supplemented with 0.5 g/l casein hydrolysate (the growth rate: 10.87) after 30 days culture. The PLB formation from callus was achieved when callus was transferred to the medium without plant growth regulators. These PLBs were cultured to MS medium supplemented with 0.5 mg/l α -NAA, 0.5 mg/l BA, 10% CW, 30 g/l sucrose, 1 g/l AC and 8 g/l agar for plantlet regeneration. Histological observation proved that these calli were embryogenic calli. Plantlets were acclimatized in the green house with 100% survival rate. No morphological variation were observed in these plantlets.

1. Đặt vấn đề

Trong thế giới các loài hoa, địa lan là một trong những loài cho hoa đẹp, bền và sang trọng, là nữ hoàng của các loài hoa. Hiện nay, trong lĩnh vực hoa chậu và hoa cắt cành thì địa lan là một trong những giống hoa xếp vị trí đầu bảng. Nghề nuôi trồng hoa lan đã trở

thành một bộ phận chủ yếu nhất của ngành trồng hoa cảnh xuất khẩu của nhiều nước.

Thực tế, nhiều loại lan đang mất dần do tốc độ khai thác cao, nhiều loài bị thoái hóa do nhân giống vô tính trong thời gian dài không được phục tráng (Arditti, 1982). Vì vậy, việc phục tráng, nuôi cấy đỉnh sinh

trưởng để tạo cây giống đồng nhất và sạch bệnh đối với địa lan là rất cần thiết. Với kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* không những tạo ra một số lượng lớn cây giống đồng nhất trong một thời gian ngắn mà còn ngăn cản sự thoái hoá giống, đặc biệt là những giống lan lai, có tiềm năng kinh tế lớn.

Đối tượng địa lan Vàng Hoàng hậu (*Cymbidium* hybrid "FX750") thuộc loại lan lai, nhập từ Nhật và đang được ưa chuộng hiện nay bởi khả năng cho hoa to, bền với cánh hoa dày và sắc hoa đẹp, quý phái. Cây có thể cho từ 5 đến 12 cành/chậu. Mỗi cành có thể mang từ 12 - 20 hoa. Các cánh và đài hoa khép kín, cân đối (Hình 1). Trong dịp Tết Nguyên đán năm Bính Thân 2016 vừa rồi, mỗi cành hoa có thể có giá từ 1,8 đến 2,8 triệu đồng (dantri.com.vn).

Việc nuôi cấy mô phân sinh chồi ngọn là hữu hiệu hơn cả trong vi nhân giống *in vitro*. Tuy đây là loại mô có kích thước rất nhỏ và khó nuôi cấy nhưng với phương pháp này sẽ thu được các cây con đồng đều và sạch bệnh (Neumann và cs., 2009). Bên cạnh đó, sự hình thành mô sẹo có khả năng phát sinh phôi từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng cùng với quá trình biệt hóa từ phôi thành protocorm like-body (PLB) và tạo cây con cũng được tiến hành. Trên địa bàn thành phố Đà Lạt, nhân giống địa lan rất phổ biến và thường là tạo và nhân PLB. Trong nghiên cứu này, sự hình thành phôi sinh dưỡng từ mô sẹo nuôi cấy đỉnh sinh trưởng và nhân nhanh các phôi này là mục tiêu mà chúng tôi tiến hành trên giống địa lan Vàng Hoàng hậu, nhằm góp phần tăng cường công tác nhân và bảo tồn giống địa lan có giá trị này.

2. Nội dung nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Chồi bên tách từ các giả hành của chậu lan đang cho hoa 5 năm tuổi của giống Vàng Hoàng hậu, có chiều cao từ 5 - 10cm, được dùng làm nguyên liệu để tách đỉnh sinh trưởng. Nguồn giống lấy từ công ty Langbiang Farm, Đà Lạt, Lâm Đồng (Hình 1).



A



B

Hình 1. Giống địa lan Vàng Hoàng hậu

A. Cây và cành mang hoa

B. Các chồi bên của cây.

Các thí nghiệm được tiến hành tại phòng thí nghiệm Nuôi cấy mô Thực vật thuộc trường Cao đẳng Kinh tế và Kỹ thuật Lâm Đồng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách và nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Khử trùng: Những chồi non có chiều dài từ 5 - 10 cm, được xử lý bằng tách các lá bao, rửa sạch bằng xà phòng rồi rửa lại dưới vòi nước đang chảy, khử trùng bằng cồn 70° trong 30 giây, rửa kỹ bằng nước cất vô trùng. Mẫu được tiếp tục khử trùng với dung dịch HgCl_2 0,1% (w/v) và vài giọt tween 80 trong 4 phút. Sau đó, rửa mẫu 5 lần bằng nước cất vô trùng.

Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng: Cắt bỏ các lá bao để lộ chồi ngọn trong đó có mô phân sinh đỉnh chồi được bao quanh bởi 1 - 2 phát thể lá, có đường kính 0,8mm (Hình 2A) và đặt chúng trong 40ml môi trường nuôi cấy với các bình thủy tinh thể tích 250ml với 1 mẫu/bình. Mỗi nghiệm thức: 5 bình. Thao tác được tiến hành dưới kính lúp và trong điều kiện vô trùng. Số liệu thu nhận sau 45 ngày nuôi cấy.

Môi trường nuôi cấy: Môi trường MS (Murashighe và Skoog, 1962) bổ sung 30g/l sucrose, 10% nước dừa (v/v, có chiều dày cơm 0,5cm), 1g/l AC và 8g/l agar (được xem là môi trường cơ bản), có hay không có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng α -naphthaleneacetic acid (α -NAA) (0 và 0,2mg/l) và Benzylaminopurine (BA) (0 và 2mg/l), pH của môi trường được điều chỉnh về 5,7.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nước dừa và casein thủy phân lên khả năng tăng trưởng của mô sẹo từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Các mô sẹo hình thành từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng được tiến hành nhân lên với việc cắt thành các mẫu có khối lượng 50 mg và nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 30g/l sucrose, 8g/l agar, 1g/l AC, 0,2mg/l α -NAA và 2mg/l BA, có hay không có bổ sung 10% nước dừa (v/v), 1g/l casein thủy phân (CH) hay phối hợp 10% nước dừa (v/v) và 0,5g/l CH.

Các mẫu được nuôi cấy với 5 mẫu/bình có thể tích 250ml, chứa 40ml môi trường. Mỗi nghiệm thức gồm 5 bình và nuôi cấy trong 30 ngày để theo dõi tỷ lệ tăng trưởng của mô sẹo cũng như khả năng phát sinh hình thái của mô sẹo.

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ sucrose lên khả năng hình thành PLB từ mô sẹo

Các mô sẹo trong thí nghiệm trên được tiến hành nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 10% CW, 8g/l agar, 1g/l AC, 0,5g/l CH và các nồng độ khác nhau của sucrose (0, 20, 30g/l sucrose). Các mẫu được nuôi cấy với 5 mẫu/bình có thể tích 250 ml, chứa 40 ml môi trường. Mỗi nghiệm thức 5 bình và nuôi cấy trong 60 ngày để theo dõi sự phát sinh hình thái của mô sẹo trong môi trường có các nồng độ sucrose khác nhau.

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của α -NAA và BA lên sự hình thành cây con địa lan Vàng Hoàng hậu

Các PLB có đường kính 3mm được

chuyển sang môi trường MS bổ sung 10% nước dừa (v/v), 30g/l sucrose, 1g/l than hoạt tính và 8 g/l agar, có hay không có bổ sung NAA (0, 0,5mg/l). và BA (0, 0,5mg/l) Các mẫu được nuôi cấy với 10 mẫu/bình có thể tích 500ml, chứa 60ml môi trường. Mỗi nghiệm thức 5 bình và nuôi cấy trong 60 ngày để nghiên cứu tỷ lệ hình thành cây con, chiều cao cây và số rễ/cây từ các PLB của địa lan Vàng Hoàng hậu.

2.2.5. Quan sát mô học

Làm các loại tiêu bản về mô sẹo với việc cắt lát mẫu cần quan sát, ngâm trong dung dịch javel 10% trong 15 phút, rửa nước, ngâm trong dung dịch acid acetic 45% trong 15 phút, rửa nước, nhuộm màu bằng thuốc nhuộm hai màu carmin và xanh iod trong 15 phút, rửa nước và quan sát trên kính hiển vi quang học Olympus (Nhật Bản) với độ phóng đại 40 - 100 lần.

2.2.6. Điều kiện thí nghiệm

Nhiệt độ phòng nuôi cấy: $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm trung bình: 75 - 85%, ánh sáng: 2000 ± 200 lux và thời gian chiếu sáng: 10 giờ/ngày.

2.2.7. Chỉ tiêu theo dõi và xử lý số liệu

Chỉ tiêu theo dõi

Quan sát màu sắc, hình dạng, số lá và số rễ của PLB và cây con tạo từ PLB, số PLB/mẫu.

Tỷ lệ sống sót (%): Số mẫu sống sót x 100 trên tổng số mẫu nuôi cấy.

Tỷ lệ hình thành PLB hay mô sẹo (%): Số mẫu hình thành PLB hay mô sẹo x 100 trên tổng số mẫu nuôi cấy.

Tỷ lệ tăng trưởng của mô sẹo: Khối lượng mô sẹo sau nuôi cấy/khối lượng mô sẹo ban đầu.

Tỷ lệ hình thành cây con (%): Số mẫu hình thành cây con với chồi và rễ x 100 trên tổng số mẫu nuôi cấy.

Chiều cao cây con được tính bằng chiều dài từ ngọn lá dài nhất đến cổ rễ.

Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm trên được lặp lại 3 lần. Các số liệu thu được là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Số liệu được xử lý bằng phần mềm xử lý thống kê SPSS (Statistical Program Scientific System) 16.0, phân tích thống kê bằng phép thử Duncan (Duncan, 1995) ở mức $P < 0,05$.

3. Kết quả và thảo luận**3.1. Tách và nuôi cấy đỉnh sinh trưởng**

Sau 45 ngày nuôi cấy, các mô phân sinh ngọn chồi có tỷ lệ sống sót và tạo PLB hình cầu, màu xanh vàng và mô sẹo màu vàng, dạng hạt với số liệu thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Sự tạo mô sẹo và PLB địa lan Vàng Hoàng hậu từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Môi trường nuôi cấy	Tỷ lệ mẫu sống sót (%)	Tỷ lệ mẫu hình thành PLB (%)	Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo
Môi trường cơ bản	60,00 ^{b*}	40,00 ^b	0,00 ^c
Môi trường cơ bản + 0,2mg/l α -NAA	60,00 ^b	53,33 ^a	6,67 ^b
Môi trường cơ bản + 2mg/l BA	53,33 ^b	53,33 ^a	0,00 ^c
Môi trường cơ bản + 0,2mg/l α -NAA và 2mg/l BA	86,67 ^a	40,00 ^b	46,67 ^a

*Ghi chú: *Các mẫu tự khác nhau (a,b,...) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với $P < 0,05$ bằng phép thử Duncan.*

Tỷ lệ sống sót đạt cao trên môi trường cơ bản bổ sung 0,2mg/l α -NAA và 2mg/l BA (86,67%). Tỷ lệ tạo PLB cao nhất đạt được trên loại môi trường cơ bản bổ sung 0,2mg/l α -NAA hay 2mg/l BA (53,33%). Tỷ lệ tạo mô sẹo đạt cao nhất trên môi trường cơ bản bổ sung 0,2mg/l α -NAA và 2mg/l BA (46,67%). Trong thí nghiệm này, các mẫu mô chứa đỉnh sinh trưởng được tách ra có kích thước khoảng 1mm, mang 1 - 2 phát thể lá (Hình 2A). Mô phân sinh ngọn chồi phát triển từ một khối tròn trong suốt sau 1 tuần nuôi cấy, phát triển mô, hình thành mô sẹo và PLB sau 45 ngày nuôi cấy (Hình 2B, 2C). Đây là mô mẫu rất khó nuôi cấy do có kích thước nhỏ (khoảng 100 μ m đến 900 μ m tùy theo loài) (Bùi Trang Việt, 2002). Tuy nhiên, để tạo cây sạch virus, ta có thể nuôi cấy vùng mô phân sinh ngọn với 2 - 4 phát thể lá kề bên (Neumann & cs., 2009). Như vậy, có thể nói rằng, đỉnh sinh trưởng (gồm mô phân

sinh và 1-2 phát thể lá) được tách ra trong thí nghiệm này là có thể chấp nhận được trong phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. Đây là kỹ thuật vừa tạo ra cây sạch bệnh virus vừa cho tỷ lệ nhân giống cao bởi vì đỉnh sinh trưởng là bộ phận đặc biệt nhất của cây, không chỉ được che chắn bởi những sơ khởi lá mà tại vị trí này, hệ thống mạch chưa liên kết tới; Do đó, thường không bị xâm nhiễm bởi virus vốn đi vào cây thông qua hệ thống này. Hơn nữa, sự di chuyển của virus không theo kịp với tốc độ phân chia tế bào ở vùng mô phân sinh ngọn (Morel, 1960). Kỹ thuật này cho phép nhân giống với một tỷ lệ nhân giống cao vì bộ phận đỉnh sinh trưởng còn ở giai đoạn non, chứa các tế bào gốc nên quá trình phân chia và phân hóa diễn ra mạnh.

Kết quả này phù hợp với các kết quả về nuôi cấy đỉnh sinh trưởng và nhân PLB của Morel (1960) và Neumann & cs. (2009). Việc

tách đỉnh sinh trưởng có kích thước 100 x 200µm với các tế bào sinh trưởng và phân chia nhanh (tế bào nhỏ, nhân to, tế bào chất đậm đặc) trong nuôi cấy ở đây là phù hợp với kết luận của về tính sạch bệnh và nhân nhanh của đỉnh sinh trưởng khi quan sát mức độ nhiễm virus trong cây từ gốc đến ngọn (Morel, 1960, 1964; Neumann & cs., 2009). Do đó, nuôi cấy đỉnh sinh trưởng được ứng dụng rộng rãi để tạo các giống sạch bệnh trong nông nghiệp như khoai tây, lúa, mía,... đặc biệt là sự tái tạo các cây cảnh quý như lan, rút ngắn được thời gian sinh trưởng (Murashige và Skoog, 1962). Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng cũng là một trong những kỹ thuật phổ biến nhất để đảm bảo những đặc tính di truyền của cây mẹ được bảo tồn trong những cây tái sinh (Morel, 1960, tr. 496; Morel, 1964, tr. 475; Neumann & cs., 2009, tr. 130).

Các kết quả trên cho thấy, tỷ lệ sống sót khi nuôi cấy đỉnh sinh trưởng Vàng Hoàng hậu cao hơn so với các kết quả nghiên cứu của Huyen & cs., (2004) trên các đối tượng địa lan khác như: Tím Hột, Trắng Bà rịa, Tím Nghĩa,... Điều này có thể do phụ thuộc vào loài, môi trường nuôi cấy cũng như mẫu nuôi cấy. Bên cạnh sự hình thành PLB thì sự hình thành mô sẹo từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng là điều đáng ghi nhận, trong khi nghiên cứu của Huan & cs., (2004) hay mới đây là nghiên cứu của Teixeira và Minarto, 2016 đều sử dụng

PLB địa lan để tạo mô sẹo. Sự phối hợp của auxin như α -NAA, làm kéo dài tế bào, kích thích sự tạo mô sẹo, khởi phát sự tạo mới mô phân sinh ngọn chồi và BA, kích thích sự phân chia tế bào (Bùi Trang Việt, 2002, tr.88, 100) đã giúp mô phân sinh biệt hóa thành PLB và mô sẹo trong nghiên cứu khởi đầu này. Vì vậy, sự kết hợp giữa auxin α -NAA và cytokinin như BA là khả thi trong kích thích phân chia tế bào, khởi tạo cơ quan từ mô cấy. Vì vậy, môi trường MS bổ sung 10% nước dừa, 30g/l sucrose, 1g/l than hoạt tính, 8g/l agar, 0,2mg/l α -NAA và 2mg/l BA được chọn là môi trường thích hợp cho nuôi cấy đỉnh sinh trưởng giống địa lan Vàng Hoàng hậu.

3.2. Ảnh hưởng của nước dừa và casein thủy phân lên khả năng tăng trưởng của mô sẹo từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Các mô sẹo hình thành từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng được nhân lên trên môi trường cơ bản bổ sung α -NAA và BA có bổ sung nước dừa hoặc casein thủy phân. Sau 30 ngày nuôi cấy, kết quả được thể hiện qua Bảng 2.

Mô sẹo là khối tế bào chưa phân hóa nhưng có khả năng phân chia nhanh. Vì vậy, việc bổ sung các chất hữu cơ như nước dừa và casein thủy phân là cần thiết cho quá trình nhân nhanh của mô sẹo.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nước dừa và casein thủy phân lên tỷ lệ tăng trưởng của mô sẹo địa lan Vàng Hoàng hậu

Môi trường nuôi cấy bổ sung	Tỷ lệ tăng trưởng của mô sẹo (%)	Phát sinh hình thái
0	2,67 ^{d*}	Mô sẹo
10% nước dừa (v/v)	5,33 ^c	Mô sẹo
1g/l casein thủy phân	7,64 ^b	Mô sẹo
10% nước dừa (v/v) và 0,5g/l CH	10,87 ^a	Mô sẹo

Ghi chú: *Các mẫu tự khác nhau (a,b,...) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với $P < 0,05$ bằng phép thử Duncan.

Kết quả cho thấy, trên môi trường cơ bản bổ sung 10% nước dừa và 0,5g/l CH là hữu hiệu hơn cả với tỷ lệ tăng trưởng của mô sẹo đạt cao nhất 10,87 lần so với mẫu mô sẹo ban đầu (Hình 2D). Kết quả này khá cao so với kết quả của Huan & cs. (2004, tr. 1446) sử dụng 2g/l tryptone trên đối tượng địa lan *Cymbidium Twilight Moon* “Day Light” (cho tỷ lệ tăng trưởng của mô sẹo là 9,7). Nước dừa có nhiều chất khoáng, vitamin, là những chất góp phần hỗ trợ sự sinh trưởng và phát triển của mô thực vật, đặc biệt là các cây họ Lan (Orchidaceae) (Neumann & cs., 2009). Casein thủy phân lại chứa nhiều các acid amine, hỗ trợ các tế bào thực vật phát triển (Miflin và

Lea, 1980) Việc phối hợp nước dừa và CH mặc dù ở nồng độ không cao đã cho thấy kết quả khả quan trong nuôi cấy mô sẹo địa lan so với việc không bổ sung hay bổ sung đơn lẻ các chất hữu cơ này.

3.3. Ảnh hưởng của sucrose lên khả năng tăng sinh và phát triển của mô sẹo địa lan Vàng Hoàng hậu sau 60 ngày nuôi cấy

Đường (sucrose) là nguồn carbon quan trọng, ảnh hưởng đến quá trình phát sinh hình thái và tạo năng lượng cho các phản ứng sinh lý, sinh hóa của thực vật. Kết quả về ảnh hưởng của nồng độ sucrose lên khả năng tăng sinh và phát triển của mô sẹo địa lan Vàng Hoàng hậu được thể hiện qua bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của sucrose lên khả năng tăng sinh và phát triển của mô sẹo địa lan Vàng Hoàng hậu sau 60 ngày nuôi cấy.

Nồng độ sucrose (g/l)	Tỷ lệ tạo PLB (%)	Số PLB/mô sẹo	Khối lượng của 1 TB PLB (mg)	Tỷ lệ tạo mô sẹo (%)	Khối lượng của 1 cụm mô sẹo (mg)	Tỷ lệ tăng trưởng của mô sẹo
0	100,00 ^{a*}	22,50 ^c	21,2 ^b	0,00 ^c	0,0 ^c	0,00 ^c
20	100,00 ^a	79,67 ^b	39,2 ^a	0,00 ^c	0,0 ^c	0,00 ^c
30	60,93 ^b	93,33 ^a	40,3 ^a	39,07 ^b	469,5 ^b	9,39 ^b
40	24,67 ^c	94,67 ^a	41,1 ^a	75,33 ^a	647,5 ^a	12,95 ^a

Ghi chú: *: Các mẫu tự khác nhau (a,b,...) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với $P < 0,005$ bằng phép thử Duncan.

Đường là yếu tố quan trọng giúp phối trưởng thành và tích lũy các chất dinh dưỡng phục vụ cho sự hình thành cây. Khi không bổ sung đường, mô sẹo biệt hóa thành PLB. Tuy nhiên, những PLB này có khối lượng thấp, kém phát triển. Nồng độ đường thấp (20g/l) có khuynh hướng làm mô sẹo biệt hóa thành các PLB màu xanh đậm và cây con (Hình 2G). Ngược lại, nồng độ sucrose cao sẽ có khuynh hướng tăng sinh mô sẹo. PLB thu được từ nghiệm thức bổ sung 40g/l sucrose có màu vàng xanh, có khối lượng trung bình khá to nhưng lại tiếp tục nhân PLB mà không phát triển thành cây. PLB của lan sẽ không trở nên xanh và không thể phát triển thành cây con nếu sucrose hiện diện cao trong môi trường trước giai đoạn biệt hóa của PLB từ mẫu cấy.

Nồng độ sucrose 40g/l làm 75,33% mô sẹo vẫn tăng sinh, không biệt hóa thành PLB ngay cả khi không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật CDHSTTV vào môi trường nuôi cấy. Kết quả này cũng khẳng định về vai trò của sucrose trong sự phát sinh hình thái của lan như các nghiên cứu của Huan & cs., 2004, tr.1447 trên *Cymbidium*, của Ishii & cs., 1998, tr.448 trên *Phalaenopsis*.

Như vậy, bằng phương pháp tăng hay giảm nồng độ đường đã làm mô sẹo có thể tiếp tục tăng sinh hay biệt hóa thành PLB.

Số PLB hình thành từ mô sẹo đạt từ 22,5 – 94,67 PLB trên mẫu mô sẹo có khối lượng 50 mg (Hình 2F) cũng như tỷ lệ tăng trưởng của mô sẹo đạt gấp 9,39 đến 12,95

lần so với mẫu mô sẹo 50 mg ban đầu sau 60 ngày nuôi cấy là điều đáng ghi nhận. So với việc nhân PLB từ PLB theo phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào, hệ số nhân cũng chỉ đạt cao nhất là 17 – 32,22 PLB (Trần Thị Ngọc Lan & cs., 2014).

Vì vậy, sự tăng sinh mô sẹo và hình thành PLB từ mô sẹo là phương thức nhân

giống nhanh và hiệu quả, đặc biệt là đối với những loài lan sinh trưởng chậm như địa lan.

3.4. Ảnh hưởng của α -NAA và BA lên sự hình thành cây con địa lan Vàng Hoàng hậu

Sau khi được chuyển sang môi trường tạo cây, các PLB phát triển hình thành chồi, rễ, tạo cây con hoặc tiếp tục nhân PLB. Kết quả được thể hiện qua Bảng 4.

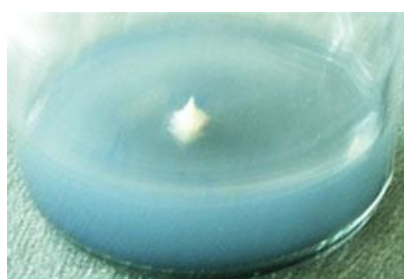
Bảng 4. Ảnh hưởng của α -NAA và BA lên sự hình thành cây con địa lan Vàng Hoàng hậu sau 60 ngày nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy bổ sung	Tỷ lệ hình thành cây con từ PLB (%)	Tỷ lệ hình thành PLB (%)	Chiều cao cây (cm)	Số rễ/cây
0	85,33 ^{a*}	14,67 ^d	4,73 ^b	2,85 ^b
0,5mg/l α -NAA	34,67 ^c	65,33 ^b	3,50 ^c	3,16 ^b
0,5mg/l BA	11,33 ^d	88,67 ^a	2,15 ^d	0,63 ^c
0,5mg/l α -NAA + 0,5mg/l BA	75,33 ^b	24,67 ^c	6,47 ^a	4,58 ^a

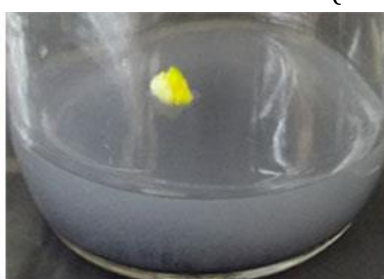
Ghi chú: *Các mẫu tự khác nhau (a,b,...) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với $P < 0,05$ bằng phép thử Duncan.

Trên môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật, có đến 85,33% số PLB hình thành cây con với đầy đủ chồi và lá. Điều này cho thấy bản chất phôi sinh dưỡng của PLB. Tuy nhiên, tại nghiệm thức này, chiều cao cây và số rễ/cây không bằng

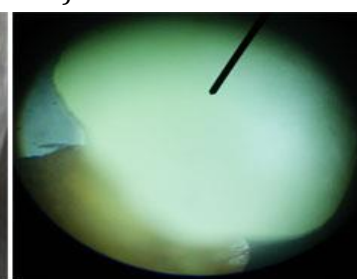
chiều cao cây và số rễ/cây tại nghiệm thức có bổ sung 0,5mg/l α -NAA và 0,5mg/l BA. Tỷ lệ bằng 1 giữa α -NAA và BA cho thấy sự phối hợp, hỗ trợ của hai CDHSTTV này giúp PLB nhanh biệt hóa và phát triển thành cây. Cây hình thành với trung bình 3 - 4 lá xanh và 3 - 5 rễ (Hình 2H).



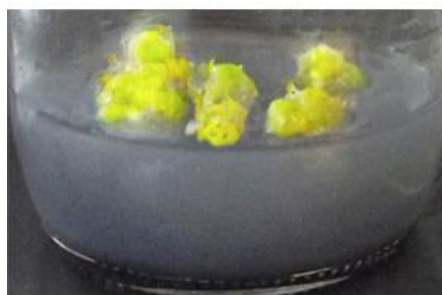
A



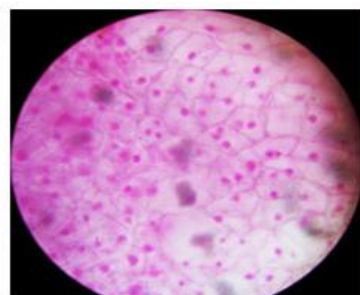
B



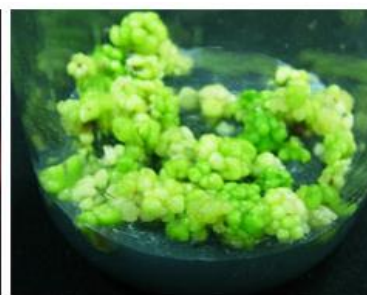
C



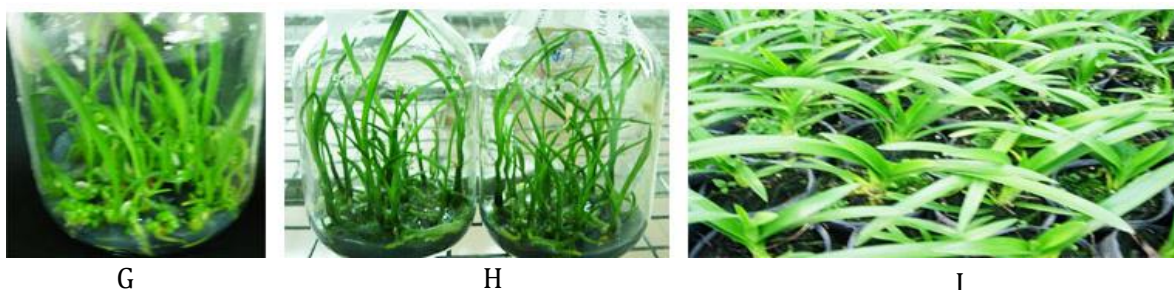
D



E



F



Hình 2. Các giai đoạn hình thành mô sẹo, PLB và cây con địa lan Vàng Hoàng hậu bằng phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

- A. Mẫu chồi ngọn chứa đỉnh sinh trưởng.
- B. Sự hình thành mô sẹo từ đỉnh sinh trưởng sau 30 ngày nuôi cấy (mũi tên).
- C. Một PLB phát sinh từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng (mũi tên).
- D. Sự hình thành mô sẹo có khả năng phát sinh phôi.
- E. Tiêu bản nhuộm màu mẫu mô sẹo có khả năng phát sinh phôi.
- F. Sự hình thành các PLB từ mô sẹo.
- G. Phát sinh cây con từ các PLB.
- H. Sự hình thành cây con hoàn chỉnh từ các PLB.
- I. Cây con sinh trưởng trong điều kiện *ex vitro*.

α -NAA là chất điều hòa sinh trưởng thực vật có khả năng kích thích ra rễ, kéo dài tế bào. Theo Bùi Trang Việt (2002, tr.100), “BA kích thích phân chia tế bào với điều kiện có auxin”, vì vậy, sử dụng α -NAA và BA sẽ cho rễ dày và to hơn các loại auxin khác như IAA, IBA (Peterson và Peterson, 1986). Bên cạnh đó, vẫn có một số PLB tiếp tục tạo PLB mới. Vì vậy, môi trường MS bổ sung 10% nước dừa (v/v), 30g/l sucrose, 8g/l agar 1g/l than hoạt tính, 0,5mg/l BA và 0,5mg/l α -NAA là thích hợp cho nuôi cấy hình thành cây con từ PLB.

Sau 6 tháng trồng trọt tại các hộ nông dân, trên 5000 cây con địa lan Vàng Hoàng hậu đã thích nghi và phát triển tốt trong điều kiện vườn ươm với tỷ lệ sống sót đạt 100% (Hình 2I).

3.5. Quan sát mô học

Quan sát các tiêu bản mẫu cho thấy nuôi cấy mô phân sinh ngọn địa lan sẽ hình thành PLB và mô sẹo (Hình 2B, 2C). Quan sát vi phẫu mô sẹo cho thấy tồn tại các tế bào đẳng kính, nhân to là những tế bào có khả năng hình thành phôi (Hình 2E). Nuôi cấy tiếp tục các mô sẹo này trên môi trường không bổ sung CDHSTTV, chúng sẽ biệt hóa thành các PLB và PLB lớn dần hình thành cây con. Vì vậy, có thể nói rằng PLB chính là giai đoạn phát triển sau của phôi sinh dưỡng họ Lan và mô sẹo trong nghiên cứu này là mô sẹo có khả năng phát sinh phôi. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu về phôi họ Lan của Ishii & cs., 1998; Huan & cs., 2004 và gần đây là Teixeira da Silva và Winarto, 2016.

4. Kết luận

Mô sẹo có khả năng phát sinh phôi hình thành từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng trên môi trường MS bổ sung 10% nước dừa (v/v), 30g/l sucrose, 8g/l agar, 1g/l than hoạt tính, 0,5mg/l α -NAA và 2mg/l BA với tỷ lệ hình thành mô sẹo đạt 46,67%.

Mô sẹo được nhân lên gấp 10,87 lần trên môi trường tương tự và bổ sung thêm 0,5g/l CH sau 30 ngày nuôi cấy. Các mô sẹo hình thành PLB trên môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật và hình thành cây con trên môi trường MS bổ sung 10% nước dừa (v/v), 30g/l sucrose, 8g/l agar, 1g/l AC, 0,5mg/l α -NAA và 0,5 mg/l BA. Sau 6 tháng, 100% cây sống sót và thích nghi tốt khi trồng trong nhà kính và không ghi nhận các sai hình nào từ những cây này. Đây là phương thức nhân giống nhanh và hữu hiệu từ mô sẹo bắt nguồn từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arditti J. (1982). Orchid seed germination and seedling culture – a manual, In: *Orchid biology - Reviews and perspectives vol.II*, Arditti J. (ed.), Comstock Publishing Associates, Ithaca and London, 244-370.
2. Duncan D.B. (1955). Multiple range and multiple F test. *Biometrics*, 11, 1-42.
3. Huan L.V.T., Takamura T. and Tanaka M. (2004). Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Science*, 166, 1443-1449.
4. Phan Xuân Huyền, Nguyễn Trung Ái, Nguyễn Thị Lang, Nguyễn Thị Diệu Hương, Đinh Văn Khiêm, Dương Tấn Nhựt. (2004). Phục tráng và nhân nhanh các giống địa lan (*Cymbidium* spp.) bằng nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. *Tạp chí Sinh học*, 26(1), 48-54.
5. Trần Thị Ngọc Lan, Nguyễn Hồng Hoàng, Nguyễn Du Sanh, Dương Tấn Nhựt. (2014). Nhân giống vô tính bốn giống địa lan có giá trị kinh tế cao. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 12(7), 1125-1133
6. Miflin B.J., Lea P.J. (1980). Ammonia assimilation. In: *The Biochemistry of plants*, Vol. 5, Miflin B.J. (ed.). Academic Press, New York, USA, 169-202.
7. Morel G.M. (1960). Producing virus – free *Cymbidium*, *American Orchid Society Bulletin*, 29, 495- 497.
8. Morel G.M. (1964). Tissue culture – A new means of clonal propagation of orchids, *American Orchid Society Bulletin*, 33, 473-478.
9. Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures., *Physiology Plant*, 15, 73-97.
10. Neumann N.H., Kumar A. and Imani J. (2009). Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 75-134.
11. Peterson R.L., Peterson C.A. (1986). Ontogeny and anatomy of lateral roots". In: Jackson M.B. (ed.). *New root formation in plants and cuttings*, Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1-30.
12. Teixeira da Silva JA, Winarto B. (2016). Somatic Embryogenesis in Two Orchid Genera (*Cymbidium*, *Dendrobium*). *Methods Molecular Biology*, 1359, 371-86. doi: 10.1007/978-1-4939-3061-6_18.
13. Nguyễn Tuyền. (3-2-2016). Cận cảnh địa lan vàng SJC giá "khủng", gần 3 triệu đồng/cành. Truy cập ngày 16-4-2015, <http://dantri.com.vn/kinh-doanh/can-canh-dia-lan-vang-sjc-gia-khung-gan-3-trieu-dong-can-20160203065430901>.
14. Bùi Trang Việt. (2002). *Sinh lý thực vật đại cương*, tập 2. Tp. Hồ Chí Minh: NXB. Đại học Quốc Gia Tp. HCM.