

NHÂN GIỐNG VÔ TÍNH BỐN GIỐNG ĐỊA LAN CÓ GIÁ TRỊ KINH TẾ CAO**Trần Thị Ngọc Lan¹, Nguyễn Hồng Hoàng³, Nguyễn Du Sanh², Dương Tấn Nhựt^{3*}**¹*Trường Cao đẳng Kinh tế Kỹ thuật Lâm Đồng*²*Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh*³*Viện Nghiên cứu Khoa học Tây nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Email*: duongtannhut@gmail.com

Ngày gửi bài: 07.08.2014

Ngày chấp nhận: 13.10.2014

TÓM TẮT

Thể protocorm (PLB) được hình thành từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng chồi đỉnh của 4 giống địa lan trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l α NAA, 1 mg/l BA sau 45 ngày nuôi cấy dưới điều kiện chiếu sáng. Các PLB này được nhân nhanh trên môi trường có chứa 0,5 mg/l α NAA, 1 mg/l BA, 10% nước dừa (v/v), 30 g/l sucrose, 1 g/l tryptone, 0,2 g/l glutamine, 1 g/l than hoạt tính và 8 g/l agar bằng cách nuôi cấy các lớp mỏng cắt dọc của PLB. Các PLB này được duy trì và nhân lên trên môi trường tương tự như trên sau 2 tháng, khi chúng tái sinh thành cây hoàn chỉnh khi chúng được chuyển sang môi trường MS có chứa 0,5 mg/l α NAA, 1 g/l than hoạt tính, 30 g/l sucrose, 10% nước dừa (v/v) và 8 g/l agar. Quan sát về giải phẫu đã chứng minh rằng các PLB này có nguồn gốc từ phôi vô tính. Những cây thu được với chồi và rễ phát triển trên môi trường không chứa chất điều hòa sinh trưởng sau 4 tháng. Đây là một nghiên cứu quan trọng cho việc nhân giống vô tính và bảo quản loại lan có giá trị kinh tế này.

Từ khóa: Địa lan, lớp mỏng tế bào, mô phân sinh ngọn chồi, PLB.

Micropropagation of Four Economically Valuable *Cymbidium* Species**ABSTRACT**

Protocorm-like bodies (PLBs) were formed from apical meristem culture of four *Cymbidium* species on MS medium supplemented with 0.5 mg/l α NAA, 1 mg/l BA after 45 days under light condition. PLB longitudinal thin cell layer culture was used as a technique for PLBs micropropagation on MS medium containing 0.5 mg/l α NAA, 1 mg/l BA, 10% coconut water (v/v), 30 g/l sucrose, 0.2 g/l glutamine, 1 g/l activated charcoal and 8 g/l agar. These collected PLBs were maintained and proliferated on the same medium after 2 months and then transferred to MS medium supplemented with 0.5 mg/l α NAA, 1 g/l activated charcoal, 30 g/l sucrose, 10% coconut water (v/v) and 8 g/l agar for plantlet regeneration. Histological observation proved that these PLBs originated from somatic embryos. Plantlets regenerated on medium without plant growth regulators after 4 months resulted in well-developed shoots and roots. This investigation is important for micropropagation and preservation of the high-economic *Cymbidiums*.

Keywords: Apical meristem, *Cymbidium*, thin cell layers, PLBs.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong thế giới các loài hoa, địa lan là một trong những loài cho hoa đẹp và bền, là nữ hoàng của các loài hoa. Hiện nay, nhu cầu về hoa lan trên thế giới rất cao, nghề nuôi trồng hoa lan đã trở thành một bộ phận chính yếu của ngành trồng hoa cảnh xuất khẩu của nhiều nước.

Tuy nhiên, trong thực tế, sự phát triển về số lượng lan bằng con đường sinh sản sinh dưỡng rất chậm. Một số loài lan có hạt như các loài thuộc chi *Paphiopedium*, *Cymbidium*, *Cypripedium*... nhưng những hạt này cũng rất khó nảy mầm. Không những thế, 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. 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. 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.

Bốn đối tượng địa lan: Xanh Ngọc (*Cymbidium* hybrid 'Luscious Falls'), Cam Lửa (*C. hybrid* 'Orange Glow'), Xanh Thơm (*C. hybrid* 'Green Meadow') và Vàng Trắng (*C. hybrid* 'Sunny Moon') thuộc loại lan lai và đang được ưa chuộng hiện nay bởi hoa to, bền và sắc hoa đẹp. Các giống cây này có thể cho từ 3 đến 8 cành/chậu. Mỗi cành có thể mang từ 12 - 18 hoa. Các cánh và đài hoa khép kín, cân đối (Hình 1). Việc nuôi cấy mô phân sinh chồi ngọn rất khó thực hiện vì 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. Nghiên cứu đầu tiên của Morel vào năm 1960 đã khởi đầu cho những nghiên cứu tiếp theo khi tạo cây sạch virus trên một số đối tượng lan *Cymbidium*. Năm 1964, tác giả này cũng đã đưa ra những phương pháp mới khi nhân giống vô tính một số loài lan. Ở nước ta, Phan Xuân Huyền và cs. (2004) đã phục tráng và nhân nhanh thành công một số giống địa lan bằng nuôi cấy đỉnh sinh trưởng và gần đây, Trần Thị Ngọc Lan (2013) khi nghiên cứu tạo hạt nhân tạo của cây địa lan cũng đã thu nhận được những kết quả đáng kể. Hiện nay, việc tập trung nghiên cứu các môi trường nuôi cấy để nhân PLB và tạo cây con đang tiếp tục được tiến hành, góp phần tăng cường công tác nhân giống và bảo quản địa lan.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Chồi đỉnh tách từ các chậu lan đang cho hoa 5 năm tuổi của 4 giống: Xanh Ngọc (*Cymbidium* hybrid 'Luscious Falls'), Cam Lửa (*C. hybrid* 'Orange Glow'), Xanh Thơm (*C. hybrid* 'Green Meadow') và Vàng Trắng (*C. hybrid* 'Sunny Moon') có chiều cao từ 5 - 10cm, được dùng làm nguyên liệu để tách đỉnh sinh trưởng. Nguồn giống lấy từ công ty Langbian Farm, Đà Lạt, Lâm Đồng.

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.

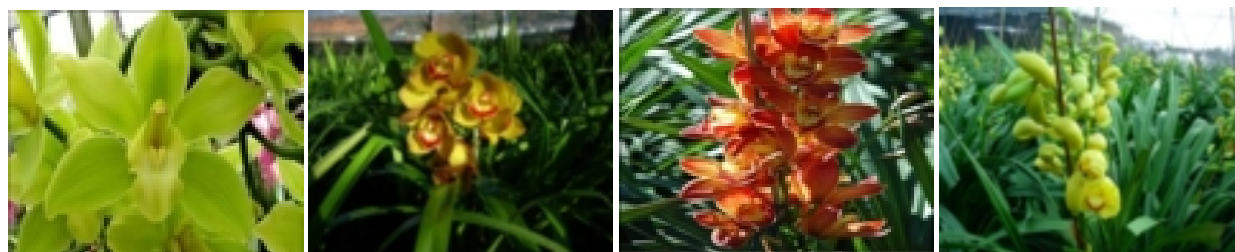
2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách và nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Khử trùng: Những chồi non có chiều dài từ 5 - 10cm, 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 chồi (được bao quanh bởi 1 phát thể lá) có đường kính 0,8mm và đặt chúng trong 20ml môi trường nuôi cấy với các bình thủy tinh thể tích 100ml với 1 mẫu/bình. Thao tác được tiến hành dưới kính lúp và trong điều kiện vô trùng.

Môi trường nuôi cấy: môi trường MS (Murashighe and Skoog, 1962) bổ sung 30 g/l



Hình 1. Các giống địa lan: Xanh Ngọc, Vàng Trắng, Cam lửa, Xanh Thơm (từ trái sang phải)

sucrose, 10% nước dừa (v/v), 1 g/l than hoạt tính, 1 g/l tryptone và 8 g/l agar (được xem là môi trường cơ bản), có hay không có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng α NAA (0; 0,2 và 0,5 mg/l) và BA (0; 0,5 và 1 mg/l), pH của môi trường được điều chỉnh về 5,7.

Các mẫu được nuôi cấy với 4 mẫu/bình có thể tích 250ml, chứa 40ml môi trường trong 45 ngày.

2.2.2. Nhân PLB 1

Các PLB hình thành từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng được tiến hành nhân lên với việc cắt thành các lớp mỏng tế bào theo chiều dọc của PLB (ITCL, chiều dày lớp 0,5mm) (Trần Thị Ngọc Lan, 2013) và nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 10% nước dừa (v/v), 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 1 g/l than hoạt tính, 1 g/l tryptone, 0,2 g/l glutamine, 0,5 mg/l α NAA và 1 mg/l BA.

Các mẫu được nuôi cấy với 5 mẫu/bình có thể tích 250ml, chứa 40ml môi trường trong 60 ngày. Sau đó, tiếp tục nhân các PLB để đủ số lượng ra cây.

2.2.3. Nhân PLB 2

Các PLB hình thành từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng được tiến hành nhân lên với việc cắt thành các lớp mỏng tế bào theo chiều dọc của PLB (ITCL, chiều dày lớp: 0,5mm) (Trần Thị Ngọc Lan, 2013) và nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 10% nước dừa (v/v), 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 1 g/l than hoạt tính, 1 g/l tryptone, 0,2 g/l glutamine và 0,1 mg/l TDZ.

Các mẫu được nuôi cấy với 5 mẫu/bình có thể tích 250ml, chứa 40ml môi trường trong 60 ngày.

2.2.4. Hình thành cây con

Các PLB có đường kính 3mm được chuyển sang môi trường MS bổ sung 10% nước dừa (v/v), 30 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính và 8 g/l agar, có hay không có bổ sung 0,5 mg/l α NAA để nghiên cứu tỷ lệ hình thành cây con từ các PLB của 4 giống địa lan sau 90 ngày nuôi cấy.

2.2.5. Quan sát mô học

Làm các loại tiêu bản về PLB 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 2.000 ± 200 lux và thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày.

2.3. Chỉ tiêu theo dõi và xử lý số liệu

2.3.1. 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 (%): số mẫu hình thành PLB x 100 trên tổng số mẫu nuôi cấy.

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

2.3.2. Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm trên được lặp lại 3 lần, mỗi lần cấy 3 mẫu/nghiệm thức. Các số liệu thu được là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Số liệu được xử lý bằng phần mềm 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. Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng của 4 giống địa lan

Sau 45 ngày nuôi cấy, các mô phân sinh ngọn chồi có tỷ lệ sống sót và tạo PLB hình cầu, màu xanh vàng với số liệu thể hiện ở bảng 1, 2, 3 và 4.

Trên 4 loại môi trường đều có tỷ lệ sống sót đạt trong khoảng 25,00 - 83,33%. Tỷ lệ sống sót đạt cao nhất trên môi trường cơ bản bổ sung 0,5 mg/l α NAA và 1 mg/l BA trên cả 4 giống địa lan (Xanh Thơm: 83,33%; Cam Lửa: 66,67%; Vàng Trắng: 75% và Xanh Ngọc: 83,33%). Tỷ lệ tạo

PLB và số PLB/mẫu nhiều nhất cũng đạt được trên loại môi trường này, tương ứng là: 83,33%; 66,67%; 75%; 75% và 5,67; 3,67; 5,33; 5,67. Vì vậy, môi trường MS bổ sung 20% nước dừa, 30 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính, 8 g/l agar, 0,5 mg/l α NAA và 1 mg/l BA được chọn là môi trường thích hợp nhất cho nuôi cấy đỉnh sinh trưởng 4 giống địa lan nói trên.

Trong thí nghiệm này, các mẫu mô chứa đỉnh sinh trưởng được tách ra có kích thước khoảng 0,8mm, mang một 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 PLB sau 30 ngày nuôi cấy (Hình 2B). 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 et al., 2009). Như vậy, có thể nói rằng, đỉnh sinh trưởng (gồm mô phân sinh và 1 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.

Nuôi cấy mô phân sinh ngọn lan sẽ hình thành các protocorm. Từ protocorm với các điểm sinh trưởng bất định có thể được nhân lên để thành các PLB. Không như trong nuôi cấy mô sẹo *in vitro* của những loài thực vật khác, việc thiết lập gen của protocorm được xác định chính xác ngay từ protocorm hình thành ban đầu khi nuôi cấy đỉnh sinh trưởng (Morel, 1960, 1964; Neumann et al., 2009). Vì vậy, tính đồng nhất di truyền của cây từ đỉnh sinh trưởng đã được xác lập.

Kết quả này phù hợp với các kết quả về nuôi cấy đỉnh sinh trưởng và nhân PLB của Morel (1960) và Neumann et al., (2009). Việc tách đỉnh sinh trưởng có kích thước 100 x 200 μ m 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 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;

Bảng 1. Sự tạo PLB địa lan Xanh Thơm từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Môi trường nuôi cấy	Tỷ lệ mẫu sống sót (%)	Tỷ lệ mẫu hình thành PLB (%)
Môi trường MS	50,00 ^a	41,67 ^b
Môi trường MS + 0,2 mg/l α NAA + 0,5 mg/l BA	58,33 ^a	58,33 ^{ab}
Môi trường MS + 0,5 mg/l α NAA + 1 mg/l BA	83,33 ^a	83,33 ^a

Chú thích: Các chữ cái khác nhau (a,b,...) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với $P < 0,05$ bằng phép thử Duncan.

Bảng 2. Sự tạo PLB địa lan Cam Lửa từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng.

Môi trường nuôi cấy	Tỷ lệ mẫu sống sót (%)	Tỷ lệ mẫu hình thành PLB (%)
Môi trường MS	25,00 ^a	25,00 ^a
Môi trường MS + 0,2 mg/l α NAA và 0,5 mg/l BA	41,67 ^a	41,67 ^a
Môi trường MS + 0,5 mg/l α NAA và 1 mg/l BA	66,67 ^a	66,67 ^a

Chú thích: Các chữ cái khác nhau (a,b,...) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với $P < 0,05$ bằng phép thử Duncan.

Bảng 3. Sự tạo PLB địa lan Vàng Trắng từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Môi trường nuôi cấy	Tỷ lệ mẫu sống sót (%)	Tỷ lệ mẫu hình thành PLB (%)
Môi trường MS	33,33 ^a	33,33 ^a
Môi trường MS + 0,2 mg/l α NAA + 0,5 mg/l BA	50,00 ^a	50,00 ^a
Môi trường MS + 0,5 mg/l α NAA + 1 mg/l BA	75,00 ^a	75,00 ^a

Chú thích: Các chữ cái khác nhau (a,b,...) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với $P < 0,05$ bằng phép thử Duncan.

Bảng 4. Sự tạo PLB địa lan Xanh Ngọc từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Môi trường nuôi cấy	Tỷ lệ mẫu sống sót (%)	Tỷ lệ mẫu hình thành PLB (%)
Môi trường MS	33,33 ^b	33,33 ^b
Môi trường MS + 0,2 mg/l α NAA + 0,5 mg/l BA	66,67 ^a	50,00 ^{ab}
Môi trường MS + 0,5 mg/l Anaa + 1 mg/l BA	83,33 ^a	75,00 ^a

Chú thích: Các chữ cái khác nhau (a,b,...) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với $P < 0,05$ bằng phép thử Duncan

Neumann et al., 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 and 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. Vì vậy, nhân giống địa lan từ các protocorm xuất phát từ đỉnh sinh trưởng được xem là ổn định về nguồn gen và sạch bệnh (Morel, 1960, 1964; Neumann et al., 2009).

Các kết quả trên cho thấy, tỷ lệ sống sót khi nuôi cấy đỉnh sinh trưởng 4 giống địa lan cao hơn so với các kết quả nghiên cứu của Huyen et

al., (2004). Điều này có thể do phụ thuộc vào loài, môi trường nuôi cấy cũng như mẫu nuôi cấy. Ngoài ra, số PLB trên các mẫu được nuôi cấy trên môi trường bổ sung 0,5 mg/l α NAA và 1 mg/l BA là cao hơn so với nuôi cấy không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật (CĐHSTTV). Điều này cho thấy vai trò kích thích, hoạt hóa tế bào của các CĐHSTTV trong quá trình hình thành các PLB từ đỉnh sinh trưởng.

3.2. Nhân PLB 1

Các PLB được cắt thành lớp mỏng theo chiều dọc (ITCL) và tiến hành nhân lên trên môi trường cơ bản bổ sung α NAA và BA. Sau 60 ngày nuôi cấy, kết quả được thể hiện qua bảng 5.

Bảng 5. Nhân PLB của 4 giống địa lan: Xanh Thơm, Cam Lửa, Vàng Trắng, Xanh Ngọc trên môi trường bổ sung α NAA và BA

Giống địa lan	Tỷ lệ mẫu sống sót (%)	Số PLB/PLB ban đầu
Xanh Thơm	98,67 ^a	32,67 ^a
Cam Lửa	77,33 ^c	17,00 ^b
Vàng Trắng	93,67 ^{ab}	29,33 ^a
Xanh Ngọc	90,33 ^b	32,33 ^a

Chú thích: Các chữ cái khác nhau (a,b,...) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với $P < 0,05$ bằng phép thử Duncan.

Việc nhân các PLB theo phương pháp lớp mỏng tế bào với các lát cắt theo chiều dọc đã cho tỷ lệ tạo PLB mới cao hơn (17,00 - 32,67 PLB/PLB ban đầu) so với cách nhân PLB thông thường (mỗi PLB chỉ tạo được 15,00- 18,00 PLB/PLB ban đầu). Điều này cho thấy ưu thế của việc nuôi cấy mẫu theo phương pháp lớp mỏng tế bào (Teixeira da Silva et al., 2007).

Việc bổ sung α NAA và BA với nước dừa, than hoạt tính và glutamate tỏ ra hiệu quả trong việc nhân nhanh PLB ở cả 4 loại địa lan. Nước dừa chứa nhiều chất khoáng, vitamin cùng với than hoạt tính và glutamine 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 et al., 2009). Trong đó, glutamine đóng vai trò như một chất điều hòa dinh dưỡng trong sự trưởng thành của tế bào, là chìa khóa trong quá trình tổng hợp các hợp chất chứa nitơ, đặc biệt là các acid amin cần thiết cho sự sinh trưởng của thực vật, trong đó có phôi sinh dưỡng, thông qua sự điều hòa của các enzym chuyển hóa quan trọng như glutamate dehydrogenase, transaminase (Mifflin and Lea, 1980). Việc bổ sung glutamine trong môi trường nuôi cấy đã kích thích sự hình thành và gia tăng PLB. Điều này cũng phù hợp với một số công trình nghiên cứu trên thế giới về ảnh hưởng của glutamine lên sự phát triển mô thực vật (Mifflin and Lea, 1980; Zouine and Hadrami, 2007).

3.3. Nhân PLB 2

Các PLB được cắt thành lớp mỏng theo chiều dọc (ITCL) và sử dụng TDZ để nhân PLB địa lan. Sau 60 ngày nuôi cấy, kết quả nhận được thể hiện qua bảng 6.

TDZ là CDHSTTV mạnh, có thể đóng vai trò của một cytokinin và auxin (Murthy et al.,

1995). Việc bổ sung 0,1 mg/l TDZ vào môi trường nuôi cấy làm tăng số PLB được nhân lên (37,67 PLB/PLB ban đầu đối với Xanh Thơm; 22,00 PLB/PLB ban đầu đối với Cam Lửa; 31,33 PLB/PLB ban đầu đối với Vàng Trắng; 34,33 PLB/PLB ban đầu đối với Xanh Ngọc). Tuy nhiên, các PLB này có chồi kéo dài, mỏng nước. Vì vậy, không sử dụng TDZ trong nuôi cấy để nhân các PLB.

3.4. Hình thành cây con

Sau khi được chuyển sang môi trường tạo cây, các PLB phát triển hình thành chồi, rễ, tạo cây con. Kết quả được thể hiện qua bảng 7.

Trên cả 2 môi trường có bổ sung và không bổ sung α NAA, tỷ lệ cây con đạt từ 23,67% - 77,33%. Cây hình thành với trung bình 2-3 lá xanh và 2-3 rễ. α NAA là chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm auxin có khả năng kích thích ra rễ, kéo dài tế bào (Bùi Trang Việt, 2002). Sử dụng α NAAsẽ cho rễ dày và to hơn các loại auxin khác như IAA, IBA (Peterson and Peterson, 1986). Bảng 7 cho thấy, trên môi trường bổ sung 0,5 mg/l α NAA, tỷ lệ tạo cây con cao hơn trên môi trường không bổ sung α NAA. 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), 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 1 g/l than hoạt tính và 0,5 mg/l α NAA là thích hợp nhất cho nuôi cấy hình thành cây con từ PLB.

Sau 6 tháng nuôi cấy, trên 5000 cây con địa lan và 5000 PLB của 4 giống địa lan: Xanh Ngọc, Cam Lửa, Xanh Thơm, Vàng Trắng đã được nhân giống thành công. Các PLB tạo được là nguồn nguyên liệu để tiếp tục nhân lên và hình thành cây con của 4 giống địa lan.

Bảng 6. Nhân PLB của 4 giống địa lan: Xanh Thơm, Cam Lửa, Vàng Trắng, Xanh Ngọc trên môi trường bổ sung TDZ

Giống địa lan	Tỷ lệ mẫu sống sót (%)	Số PLB/PLB ban đầu
Xanh Thơm	98,67 ^a	37,67 ^a
Cam Lửa	77,33 ^c	22,00 ^b
Vàng Trắng	93,67 ^{ab}	31,33 ^{ab}
Xanh Ngọc	90,33 ^b	34,33 ^{ab}

Chú thích: Các chữ cái khác nhau (a,b,...) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với $P < 0,05$ bằng phép thử Duncan

Bảng 7. Sự hình thành cây con của 4 giống địa lan: Xanh Thơm, Cam Lửa, Vàng Trắng, Xanh Ngọc

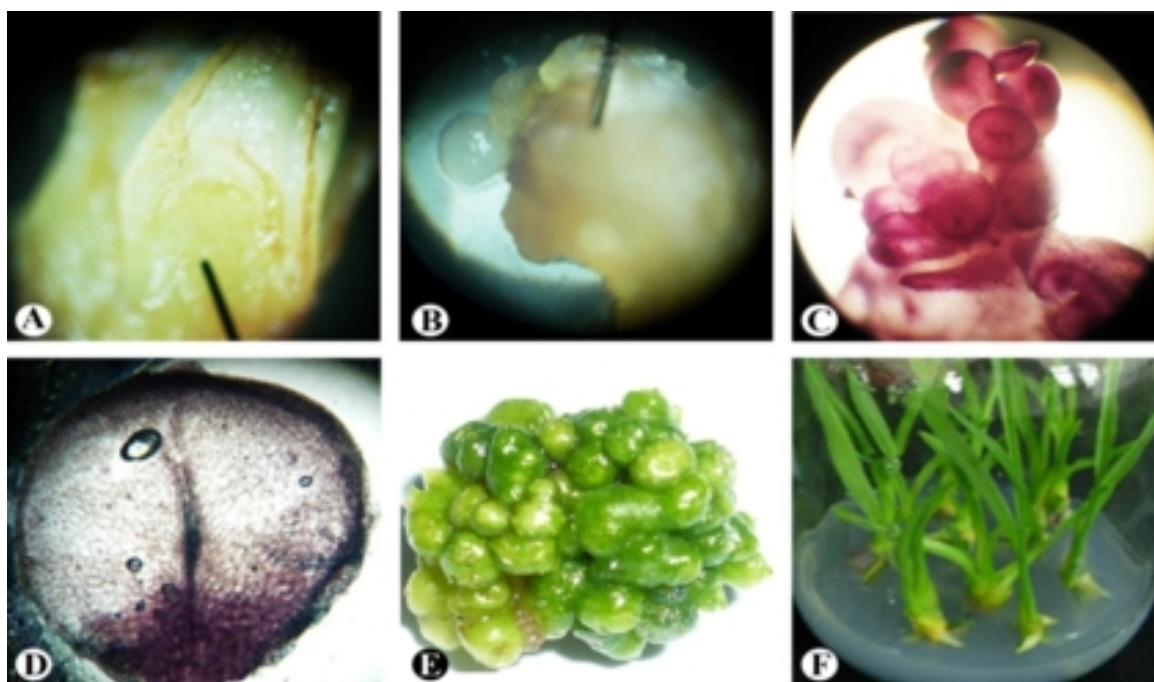
Giống địa lan	% tạo cây con trên môi trường MS không bổ sung α NAA	% tạo cây con trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l α NAA
Xanh Thơm	52,33 ^a	77,33 ^a
Cam Lửa	23,67 ^b	57,00 ^b
Vàng Trắng	43,67 ^a	63,33 ^{ab}
Xanh Ngọc	40,33 ^a	72,67 ^a

Chú thích: Các chữ cái khác nhau (a,b,...) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với $P < 0,05$ bằng phép thử Duncan

3.5. Quan sát mô học

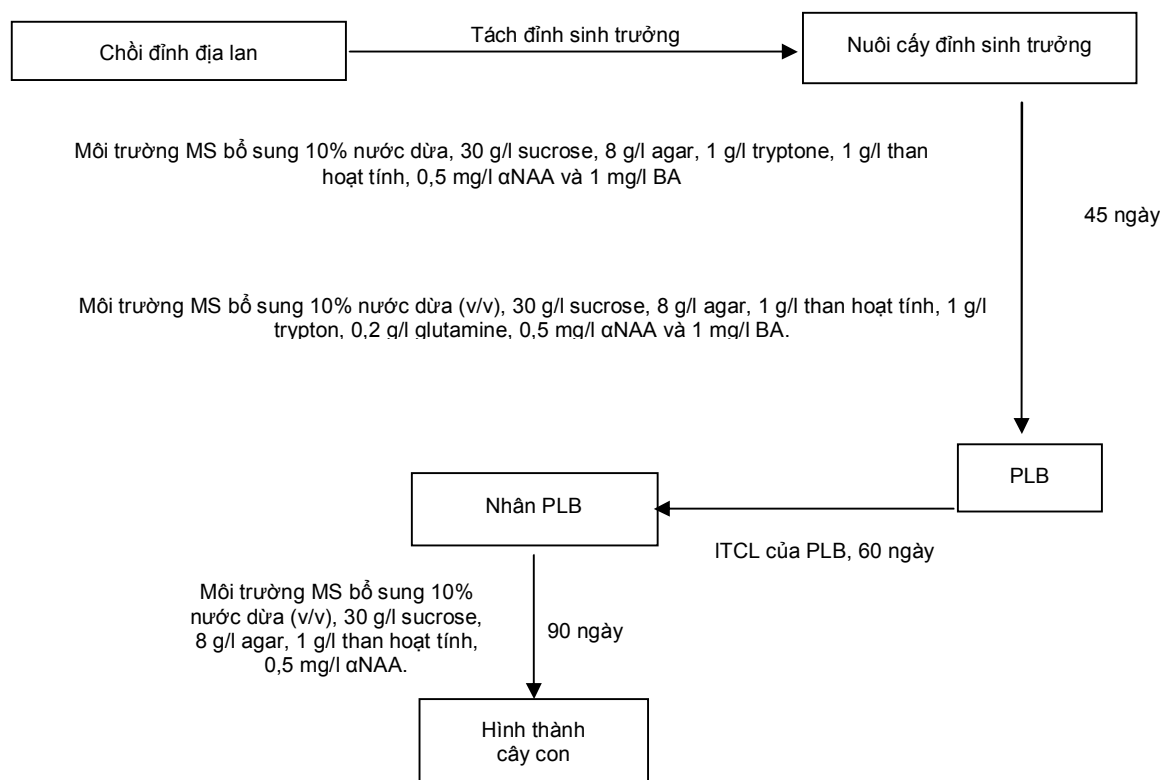
Quan sát các tiêu bản mẫu cho thấy nuôi cấy mô phân sinh ngọn địa lan sẽ hình thành PLB (Hình 2B). Nhân các PLB này sẽ hình thành các PLB thứ cấp trên nền lát cắt của PLB (Hình 2C, E). Các PLB thứ cấp này tách bạch, riêng rẽ, hình thành biểu bì và không nối mạch với mô mẹ (Hình 2C). Phần phía trên của PLB tạo nên mô phân sinh ngọn và các lá sơ khởi.

Phần đáy của PLB dần kéo dài với phần gốc sậm màu, nơi hấp thu và dự trữ các chất cần thiết cho PLB phát triển (Hình 2D). Tiếp tục nuôi cấy các PLB, chúng sẽ phát triển thành cây hoàn chỉnh (Hình 2F). Vì vậy, các PLB này là các cấu trúc phát triển từ phôi sinh dưỡng. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây về phôi sinh dưỡng địa lan (Trần Thị Ngọc Lan, 2013; Neumann và et al., 2009).



Hình 2. Các giai đoạn hình thành PLB và cây con địa lan bằng phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Ghi chú: A. Mẫu chồi ngọn chứa đỉnh sinh trưởng và các phát thể lá (200 μ m); B. Sự hình thành PLB từ đỉnh sinh trưởng sau 30 ngày nuôi cấy (1mm); C. Tiêu bản nhuộm màu về sự nhân lên của PLB từ nuôi cấy các ITCL của PLB từ đỉnh sinh trưởng sau 45 ngày nuôi cấy (700 μ m); D. Tiêu bản nhuộm màu của 1 PLB với mô mạch và đỉnh chồi (500 μ m); E. Sự nhân lên của các PLB (4mm); F. Cây con hình thành từ PLB (2cm).



Sơ đồ quy trình nhân 4 giống địa lan: Xanh Ngọc, Xanh Thơm, Cam Lửa, Vàng Trắng

4. KẾT LUẬN

Đỉnh sinh trưởng 4 giống địa lan Xanh Thơm, Cam Lửa, Vàng Trắng, Xanh Ngọc được nuôi cấy thành công trên môi trường MS bổ sung 10% nước dừa (v/v), 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 1 g/l tryptone, 1 g/l than hoạt tính, 0,5 mg/l αNAA và 1 mg/l BA.

Phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào với các mẫu ITCL được xem là phù hợp trong sự nhân nhanh các PLB. Môi trường MS bổ sung 10% nước dừa (v/v), 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 1 g/l than hoạt tính, 1 g/l tryptone, 0,2 g/l glutamine, 0,5 mg/l αNAA, 1 mg/l BA là thích hợp nhất cho nuôi cấy để nhân các PLB hình thành từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng 4 giống địa lan với số PLB đạt từ 17,00 - 32,67 PLB/PLB ban đầu.

Sự hình thành cây con từ các PLB của 4 giống địa lan này đạt kết quả cao nhất trên môi trường MS bổ sung 10% nước dừa (v/v), 30 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính, 0,5 mg/l αNAA và 8 g/l agar.

Xây dựng được quy trình nhân giống của 4 giống địa lan Xanh Thơm, Cam Lửa, Vàng Trắng, Xanh Ngọc.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn trường Cao đẳng Kinh tế Kỹ thuật Lâm Đồng đã hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Duncan D.B. (1995). Multiple range and multiple F test. Biometrics, 11: 1-42.
- Phan Xuân Huyền, Nguyễn Trung Ái, Nguyễn Thị Lang, Nguyễn Thị Diệu Hương, Đinh Văn Khiêm và Dương Tấn Nhứt (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.
- Trần Thị Ngọc Lan (2013). Nghiên cứu tạo hạt nhân tạo của cây địa lan (*Cymbidium* spp.). Luận án tiến sĩ Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh, tr. 184.
- Miflin B.J. and Lea P.J. (1980). Ammonia assimilation. In: Miflin B.J. (Ed.) The Biochemistry of plants. Academic Press, New York, USA, pp.169-202.

- Morel G.M. (1960). Producing virus-free *Cymbidium*. Amer. Orchid Soc. Bull., 29: 495-497.
- Morel G.M. (1964). Tissue culture – A new means of clonal propagation of orchids. Amer. Orchid Soc. Bull., 33: 473-478.
- Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. Physiol. Plant, 15: 73-97.
- Murthy B., Murch S. and Saxena P. (1995). Thidiazuron induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. Physiol. Plant, 94: 268-276.
- Neumann N.H., Kumar A. and Imani J. (2009). Plant cell and tissue culture - A tool in biotechnology. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 75-134.
- Peterson R.L. and 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, pp. 1-30.
- Teixeira da Silva J.A., Tran Thanh Van K., Biondi S., Nhut D.T. and Altamura M.M. (2007). Thin celllayers: Developmental building blocks in ornamental biotechnology. Floricult. Ornament. Biotechnol., 1(1): 1-13.
- Bùi Trang Việt (2002). Sinh lý thực vật đại cương - Tập 2. Nhà xuất bản. Đại học Quốc Gia thành phố Hồ Chí Minh, tr. 333.
- Zouine J. and Hadrami I. (2007). Effect of 2,4-D, glutamine and BAP on embryogenic suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Sci. Horticult., 112(2): 221-226.