

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY HOA LAN *MILTONIA* SP.**Phan Xuân Huyền^{1*}, Hoàng Văn Cường¹, Nguyễn Thị Phụng Hoàng²****¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, ²Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam***Email^{*}: phanxuanhuyen1974@gmail.com*

Ngày gửi bài: 25.07.2014

Ngày chấp nhận: 09.10.2015

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, những cụm chồi mang 3 - 4 protocorms tạo thành từ đỉnh sinh trưởng của giống *Miltonia* sp. màu đỏ và màu trắng hồng được dùng làm nguồn nguyên liệu cho các thí nghiệm. Protocorms được nuôi cấy trên các môi trường MS, MS có bổ sung nước dừa, BA độc lập và BA kết hợp với α NAA, 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 1 g/l than hoạt tính, pH 5.8. Sau 90 ngày nuôi cấy, kết quả cho thấy, môi trường $\frac{1}{2}$ MS có bổ sung 15% nước dừa, 1,5 mg/l BA và 0,1 mg/l α NAA là tốt nhất cho sự hình thành chồi và sinh trưởng chồi cây (25,60 chồi/mẫu, chiều cao 1,95cm). Đối với thí nghiệm tạo rễ *in vitro*, sau 40 ngày nuôi cấy, môi trường $\frac{1}{2}$ MS có bổ sung 0,1 - 1 mg/l α NAA hoặc 0,1 - 1 mg/l IBA, 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 1 g/l than hoạt tính, pH 5,8 đều thích hợp cho quá trình tạo rễ *in vitro*, tỉ lệ tạo rễ 100%. Sau 50 ngày chuyển cây con ra vườn ươm, kết quả cho thấy, giá thể vụn xơ dừa và dớn đều thích hợp cho quá trình sinh trưởng của cây con, tuy nhiên giá thể vụn xơ dừa (6 rễ/mẫu, chiều dài rễ 3,29cm, tỉ lệ sống 90%) tốt hơn giá thể dớn (5,60 rễ/mẫu, chiều dài rễ 2,70cm, tỉ lệ sống 86%).

Từ khóa: Hình thành protocorms, *Miltonia* sp., sinh trưởng chồi cây, tái sinh rễ.

Study on *In vitro* Propagation of *Miltonia* sp.**ABSTRACT**

In the present study, 3 - 4 protocorms derived from meristem of red and white-pink *Miltonia* sp. were used as material source for all *in vitro* culture experiments. Effect of MS medium concentration, coconut water and BA alone or in combination with α NAA on protocorm formation and shoot growth were studied. After 90 days of culture, the results showed that half MS medium supplemented with 15% coconut water, 1.5 mg/l BA in combination with α NAA of 0.1 mg/l, 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 1 g/l activated charcoal, and pH 5.8 was the best for protocorm induction and shoot growth (25.60 shoots/explant, height of 1.95cm). Half MS medium containing 0.1 - 1 mg/l α NAA or 0.1 - 1 mg/l IBA, 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 1 g/l activated charcoal, and pH 5.8 was suitable for *in vitro* root formation after 40 days of culture and the rate of shoot formation was 100%. Coconut fiber and fern fiber were suitable substrates for plantlet growth in the greenhouse, with coconut fiber being better in terms of number of roots/explant, root length and survival rate compared to fern fiber substrate.

Keywords: *Miltonia* sp., protocorm formation, shoot growth, root regeneration.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đà Lạt - Lâm Đồng có điều kiện tự nhiên thích hợp cho sự sinh trưởng, phát triển của hệ thực vật và đã trở thành trung tâm trồng hoa, rau của cả nước. Trong đó, lan *Miltonia* sp., một giống hoa nhập nội có nguồn gốc từ Brazil, là một giống cây trồng có giá trị kinh tế cao, mỗi chậu hoa có giá từ vài trăm ngàn đồng đến vài

triệu đồng bởi vì dáng hoa đẹp, bền và phong phú về màu sắc. Trên thế giới đã có những công trình nghiên cứu về cây hoa *Miltonia* sp. như: Stefanello et al. (2009) đã nghiên cứu sự hình thành protocorms và tái sinh cây con từ đỉnh rễ và mẫu lá, Besson et al. (2010) đã nghiên cứu ảnh hưởng các loại đường và nồng độ đường lên sự sinh trưởng của cây và tái sinh rễ *in vitro*. Chapla et al. (2009) nghiên cứu ảnh hưởng, tác

động của than hoạt tính, pH và giá thể lên sự sinh trưởng của cây *in vitro*. Stefanello et al. (2009) và Yamakami et al. (2009) đã nghiên cứu ảnh hưởng, tác động của các loại giá thể lên sự sinh trưởng của cây con ở giai đoạn *ex vitro*. Nhưng ở nước ta hiện nay, chưa có công bố nào nghiên cứu nhân giống *in vitro*, cũng như nghiên cứu ở giai đoạn *ex vitro* của cây hoa lan *Miltonia* sp.

Do đó, việc tiến hành nghiên cứu nhân nhanh giống hoa này cung cấp cho người dân trồng hoa phát triển kinh tế là vấn đề cần thiết. Theo phương pháp nhân giống truyền thống bằng cách tách chiết ngoài vườn ươm tạo cây giống không đồng bộ, số lượng ít không đáp ứng nhu cầu trồng hoa trên qui mô công nghiệp, mặt khác, cây thường bị nhiễm bệnh, sinh trưởng và phát triển kém, cho hoa không đạt chất lượng. Ứng dụng kỹ thuật nhân giống *in vitro* khắc phục những hạn chế của phương pháp nhân giống truyền thống. Nghiên cứu này nhằm sản xuất giống cây con sạch bệnh cung cấp cho người dân địa phương trồng hoa chậu, góp phần tăng thêm thu nhập cho người dân địa phương.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Chồi non hoa *Miltonia* sp. màu đỏ và màu trắng hồng có chiều dài 2 - 3cm (Hình a, b) được tách ra và tiến hành khử trùng. Các chồi non được rửa sạch qua nước xà phòng, sau đó khử trùng qua cồn 70° trong 1 phút và cuối cùng khử trùng qua dung dịch $HgCl_2$ 0,1% trong 10 phút. Mẫu sau khi khử trùng xong được tiến hành tách đỉnh sinh trưởng và cấy trên môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962) có bổ sung 1 mg/l BA (6-benzyl adenin), 0,2 mg/l α NAA (α -naphthalene acetic acid), 10% nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, pH 5,8 (Phan Xuân Huyền và cs., 2004).

2.2. Phương pháp

Môi trường và điều kiện nuôi cấy: Môi trường sử dụng trong nghiên cứu này là môi trường MS, tùy theo mục đích của các thí nghiệm mà bổ sung độc lập hay phối hợp giữa

các chất kích thích sinh trưởng BA, α NAA, IBA (indole-3-butyric), nước dừa, than hoạt tính, sucrose, agar, pH 5,8. Thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 2.500 lux, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ C$ và độ ẩm không khí là 75 - 85%.

Khảo sát ảnh hưởng của môi trường MS lên sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây: Các cụm chồi mang 3 - 4 protocorms (Hình c) được cấy trên môi trường 1/4 MS (giảm đi 3/4 khoáng đa, vi lượng và vitamin), 1/2 MS (giảm đi 1/2 khoáng đa, vi lượng và vitamin) và MS có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 1 g/l than hoạt tính, pH 5,8. Chỉ tiêu theo dõi là số chồi tạo thành và chiều cao của chồi cây (cm). Chỉ tiêu chiều cao cây được tính là trung bình của từng cụm, sau đó tính trung bình của các cụm trong một nghiệm thức.

Khảo sát ảnh hưởng của nước dừa lên sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây: Từ kết quả thu được ở thí nghiệm trên, chọn môi trường tốt nhất sau đó bổ sung nước dừa ở những nồng độ 0; 5; 10 và 15%. Vật liệu nuôi cấy là những cụm chồi mang 3 - 4 protocorms (Hình c). Chỉ tiêu theo dõi là số chồi tạo thành và chiều cao của chồi cây (cm).

Khảo sát ảnh hưởng của BA lên sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây: Từ kết quả thu được ở thí nghiệm trên, chọn môi trường tốt nhất, sau đó bổ sung BA ở các nồng độ 0; 0,5; 1; 1,5; 2 và 3 mg/l. Vật liệu nuôi cấy là những cụm chồi mang 3 - 4 protocorms (Hình c). Chỉ tiêu theo dõi là số chồi tạo thành và chiều cao của chồi cây (cm).

Khảo sát ảnh hưởng của BA và α NAA lên sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây: Từ kết quả thu được ở thí nghiệm trên chọn môi trường tốt nhất, sau đó bổ sung 0; 0,5; 1 và 1,5 mg/l BA kết hợp với 0,1 mg/l α NAA. Vật liệu nuôi cấy là những cụm chồi mang 3 - 4 protocorms (Hình c). Chỉ tiêu theo dõi là số chồi tạo thành và chiều cao của chồi cây (cm).

Khảo sát ảnh hưởng của α NAA và IBA lên sự tái sinh rễ in vitro: Các chồi *Miltonia* sp. *in vitro* đồng đều về chiều cao được cấy trên môi trường 1/2 MS có bổ sung α NAA và IBA ở các nồng độ 0; 0,1; 0,5 và 1 mg/l, 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 1 g/l

than hoạt tính, pH 5,8. Chỉ tiêu theo dõi là số rễ, chiều dài rễ (cm) và tỉ lệ tái sinh rễ (%).

Khảo sát ảnh hưởng của giá thể lên sự thích nghi và sinh trưởng của cây con ở giai đoạn ex vitro: Tiến hành chọn những cây *Miltonia* sp. đồng đều về chiều cao, số rễ, chiều dài rễ trồng trên giá thể vụn xơ dừa và dớn. Chỉ tiêu theo dõi là số rễ, chiều dài rễ (cm) và tỉ lệ sống của cây (%).

Xử lý số liệu: Đối với các thí nghiệm ở giai đoạn *in vitro*, mỗi nghiệm thức cây 15 mẫu. Ở giai đoạn *ex vitro*, mỗi giá thể trồng 100 cây con. Các số liệu được xử lý bằng phần mềm phân tích thống kê SPSS (bản 15.0) theo phương pháp Duncan's test (Duncan, 1955) đối với những thí nghiệm có từ 3 nghiệm thức trở lên và theo phương pháp T-test đối với những thí nghiệm có 2 nghiệm thức, mức độ tin cậy $P < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của môi trường MS lên sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây

Khả năng hình thành chồi và sinh trưởng chồi cây hoa *Miltonia* sp. sau 90 ngày nuôi cấy trên môi trường MS, 1/2 MS và 1/4 MS được thể hiện trên bảng 1. Kết quả thu được cho thấy môi trường 1/2 MS là tốt nhất cho sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi, với chiều cao chồi cây đạt 1,20cm, số chồi là 4,10 chồi/mẫu (Hình d2). Điều này cho thấy, khi giảm một phần hai nồng độ khoáng đa, vi lượng và vitamin của môi trường MS thì thích hợp cho sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây *Miltonia* sp. Trên môi trường 1/4 MS, sự hình thành chồi và sinh trưởng chồi cây thấp nhất, chiều cao chồi cây đạt 0,80cm, số chồi/mẫu là 3,30, có thể do hàm lượng khoáng đa, vi lượng và vitamin thấp nên sự tạo chồi và sinh trưởng chồi cây kém hơn. Trong khi đó, môi trường MS do có hàm lượng dinh dưỡng cao hơn cũng không tốt cho sự hình thành chồi và sinh trưởng chồi cây, chiều cao chồi cây đạt 0,99cm, số chồi/mẫu là 3,60. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với Chapla et al. (2009), Stefanello et al. (2009) và Besson et al. (2010) đã sử dụng môi trường 1/2 MS trong nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây hoa *Miltonia* sp.

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường MS lên sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây

Môi trường nuôi cấy	Chiều cao chồi cây (cm)	Số chồi/mẫu
MS	0,99 ^a	3,60 ^{ab}
½ MS	1,20 ^c	4,10 ^b
¼ MS	0,85 ^a	3,30 ^a

Ghi chú: "Những ký tự khác nhau (a, b, c,...) trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy $P < 0,05$ trong phép thử Duncan's test.

Như vậy, môi trường 1/2 MS là tốt nhất sự hình thành protocorms và sinh trưởng của chồi cây *Miltonia* sp. và kết quả này được sử dụng cho những thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng của nước dừa lên sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây

Sau 90 ngày nuôi cấy trên môi trường 1/2 MS bổ sung các nồng độ nước dừa khác nhau, khả năng hình thành chồi và sinh trưởng chồi cây hoa *Miltonia* sp. được thể hiện ở bảng 2. Kết quả thu được cho thấy nước dừa có tác dụng tốt lên quá trình hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây. Các nồng độ nước dừa khác nhau, sự hình thành chồi và sinh trưởng chồi cây cũng khác nhau (Hình e1, e2, e3, e4), nước dừa ở nồng độ 15% là tốt nhất, chiều cao chồi cây đạt 1,45cm, số chồi/mẫu là 6,50. Kết quả này cũng cho thấy qui luật khi tăng nồng độ nước dừa thì sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây cũng tăng lên. Trong nước dừa non rất giàu clorua, kali, magie, vitamin A, E, đồng thời, chứa một lượng muối, đường, protein phù hợp cho sự tạo thành chồi và sinh trưởng chồi cây (Nguyễn Văn Uyển, 1984). Nước dừa được sử dụng trong nuôi cấy *in vitro* cho nhiều loại cây trồng, môi trường nuôi cấy có bổ sung nước dừa làm tăng hiệu quả nhân giống *in vitro*. Hầu hết các giống lan đều thích hợp với môi trường có bổ sung nước dừa. Phan Xuân Huyền và cs. (2004) đã nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây hoa địa lan có bổ sung vào môi trường nuôi cấy 10% nước dừa. Vijayakumar et al. (2012) khi nhân giống *in vitro* cây lan *Dendrobium* sp. cũng đã sử dụng 15% nước dừa.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nước dừa lên sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây

Nồng độ nước dừa (%)	Chiều cao chồi cây (cm)	Số chồi/mẫu
0	1,21 ^{a*}	3,90 ^a
5	1,28 ^{ab}	4,60 ^{ab}
10	1,35 ^{ab}	5,80 ^{bc}
15	1,45 ^b	6,50 ^c

Ghi chú: *Những ký tự khác nhau (a, b, c,...) trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy $P < 0,05$ trong phép thử Duncan's test.

Như vậy, từ kết quả thu được cho thấy môi trường 1/2 MS bổ sung 15% nước dừa là tốt nhất cho sự hình thành chồi và sinh trưởng chồi cây *Miltonia* sp. và kết quả này được sử dụng cho những thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của BA lên sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây

Từ kết quả thu được của thí nghiệm trên, chọn môi trường 1/2 MS có bổ sung 15% nước dừa để thực hiện thí nghiệm này, khả năng hình thành chồi và sinh trưởng chồi cây hoa *Miltonia* sp. sau 90 ngày nuôi cấy trên môi trường có bổ sung các nồng độ BA được thể hiện trên bảng 3.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, sự hình thành chồi và sinh trưởng chồi cây tốt nhất khi BA ở nồng độ 1,5 mg/l, chiều cao cây đạt 1,85cm, số chồi/mẫu là 22,20 (Hình f4). Nồng độ của BA tăng 0 - 1,5 mg/l thì sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây cũng tăng lên (Hình f1, f2, f3), nhưng khi nồng độ BA tăng lên 2 - 3 mg/l thì sự hình thành chồi và sinh trưởng chồi cây giảm xuống (Hình f5, f6) và cho thấy protocorms khó phát triển thành chồi cây và có biểu hiện biến dị, có thể giải thích BA ở nồng độ cao ức chế protocorms phát triển thành chồi cây. Điều này cho thấy, nồng độ BA từ 0 - 1,5 mg/l có tác dụng thúc đẩy các protocorms phát triển thành chồi cây, nhưng khi nồng độ BA tăng lên 2 - 3 mg/l sẽ có tác dụng kìm hãm các protocorms phát triển thành chồi cây. BA là chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin có vai trò quan trọng trong phân chia tế bào và kích thích sự hình thành chồi. Bởi vậy, trong nuôi cấy mô

Bảng 3. Ảnh hưởng của BA lên sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây

Nồng độ BA (mg/l)	Chiều cao chồi cây (cm)	Số chồi/mẫu
0	1,46 ^{a*}	6,40 ^a
0,5	1,57 ^{ab}	11,60 ^b
1	1,74 ^b	16,60 ^c
1,5	1,85 ^b	22,20 ^c
2	1,82 ^b	15,70 ^c
3	1,63 ^{ab}	14,40 ^c

Ghi chú: *Những ký tự khác nhau (a, b, c,...) trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy $P < 0,05$ trong phép thử Duncan's test.

tế bào thực vật BA thường được sử dụng trong giai đoạn nhân nhanh. Nồng độ của BA được sử dụng trong nhân giống *in vitro* ở những loại cây khác nhau là khác nhau, có loại cây thích hợp ở nồng độ thấp, có loại cây thích hợp ở nồng độ cao. Hiện nay chưa thấy công bố nào sử dụng BA độc lập trong nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây hoa *Miltonia* sp. Tuy nhiên, BA đã được sử dụng nghiên cứu nhân giống trên nhiều loại cây trồng khác như: Vijayakumar et al. (2012), Rao and Barman (2014) đã nghiên cứu nhân giống *Dendrobium* sp.; Susumu et al. (1995) nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây *Codonopsis lanceolata* TRAUTV.

Như vậy, môi trường 1/2 MS bổ sung 15% nước dừa, 1,5 mg/l BA là tốt nhất cho sự hình thành chồi và sinh trưởng chồi cây.

3.4. Ảnh hưởng của BA và αNAA lên sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây

Từ kết quả thu được của thí nghiệm trên chọn môi trường 1/2 MS có bổ sung 15% nước dừa để thực hiện thí nghiệm này, khả năng hình thành chồi và sinh trưởng chồi cây hoa *Miltonia* sp. sau 90 ngày nuôi cấy trên môi trường có bổ sung các nồng độ BA kết hợp 0,1 mg/l NAA được thể hiện trên bảng 4.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, sự kết hợp giữa BA và αNAA có ảnh hưởng tích cực lên quá trình hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây. BA ở nồng độ 1,5 mg/l kết hợp với 0,1 mg/l αNAA là tốt nhất, với chiều cao chồi cây đạt 1,95cm, số chồi là 25,60 chồi/mẫu. Chiều cao của

Bảng 4. Ảnh hưởng của BA và NAA lên sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây

Nồng độ		Chiều cao chồi cây (cm)	Số chồi/mẫu
BA (mg/l)	NAA (mg/l)		
0,0	0,0	1,44 ^{a*}	6,80 ^a
0,5	0,1	1,71 ^b	13,50 ^b
1	0,1	1,86 ^{bc}	19,70 ^c
1,5	0,1	1,95 ^c	25,60 ^d

Ghi chú: *Những ký tự khác nhau (a, b, c,...) trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy $P < 0,05$ trong phép thử Duncan's test.

chồi cây tăng lên khi tăng nồng độ BA từ 0 - 1,5mg/l (Hình g1, g2, g3, g4). Sự hình thành chồi cũng tăng lên khi tăng nồng BA từ 0 - 1,5 mg/l. Chồi cây có biểu hiện xanh mượt và sinh trưởng tốt. Điều này cho thấy khi tăng nồng độ BA kết hợp với 0,1 mg/l α NAA đã kích thích sự hình thành chồi cây và sự tăng trưởng chiều cao của chồi cây, qua đây cũng cho thấy, sự kết hợp của BA và α NAA có sự tương tác nâng cao hiệu quả trong nhân giống *in vitro* cây hoa *Miltonia* sp.. Trong nhân giống *in vitro*, nhiều loại cây trồng chỉ phù hợp với các chất thuộc nhóm cytokinin, nhưng có nhiều loại cây trồng khi kết hợp các chất điều hòa sinh trưởng giữa nhóm cytokinin và auxin thì nâng cao hiệu quả trong nhân giống. Hiện nay chưa thấy công bố nào nghiên cứu kết hợp giữa BA và α NAA trong nhân giống cây hoa *Miltonia* sp., ngoại trừ công bố của Stefanello et al. (2009) nghiên cứu kết

hợp giữa 2,4-D và BA lên quá trình hình thành protocorms cây hoa *Miltonia* sp. từ đỉnh rễ và mẫu lá, kết quả cho thấy 3 mg/l 2,4D kết hợp 1 - 3 mg/l BA là thích hợp cho sự hình thành protocorms. Trên những đối tượng cây trồng khác, đã có rất nhiều nghiên cứu kết hợp giữa nhóm cytokinin và auxin như: Sunitibala and Kishor (2009) đã nghiên cứu nhân giống *Dendrobium transparens* L. và chứng minh BA kết hợp với α NAA tốt hơn BA kết hợp với IBA và IAA; Hoàng Thị Kim Hồng (2011) đã sử dụng BA và α NAA trong nhân giống *in vitro* đoạn thân cây hà thủ ô để tạo cụm chồi (8,54 chồi/mẫu).

Như vậy, kết quả thu được cho thấy môi trường 1/2 MS có bổ sung 1,5 mg/l BA và 0,1 mg/l α NAA là tốt nhất cho sự hình thành chồi và sinh trưởng chồi cây.

3.5. Khảo sát ảnh hưởng của α NAA và IBA lên sự tái sinh rễ *in vitro*

Khả năng tái sinh rễ *in vitro* của các chồi cây hoa *Miltonia* sp. sau 40 ngày nuôi cấy trên môi trường 1/2 MS có bổ sung các nồng độ α NAA và IBA độc lập được thể hiện trên bảng 5.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, các chồi cây ở các nồng độ của α NAA và IBA (0 - 1 mg/l) đều ra rễ 100%, tuy nhiên ở những nồng độ khác nhau thì sự tái sinh rễ khác nhau (Hình h1, h2, h3, h4; Hình i1, i2, i3, i4). Ảnh hưởng của IBA lên chồi cây tái sinh rễ nhiều hơn α NAA, cụ thể ở nồng độ 1 mg/l IBA tạo ra 6,10 rễ/mẫu, trong

Bảng 5. Ảnh hưởng của α NAA và IBA lên sự tái sinh rễ *in vitro*

Nồng độ α NAA (mg/l)	Nồng độ IBA (mg/l)	Tỉ lệ tạo rễ (%)	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)
0		100	1,80 ^{a*}	2,40 ^b
0,1		100	3,10 ^b	2,27 ^b
0,5		100	4,00 ^{bc}	2,13 ^b
1		100	4,90 ^c	1,85 ^a
	0,1	100	3,20 ^b	2,11 ^b
	0,5	100	4,90 ^c	1,95 ^{ab}
	1	100	6,10 ^d	1,79 ^a

Ghi chú: *Những ký tự khác nhau (a, b, c,...) trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy $P < 0,05$ trong phép thử Duncan's test.

khí đó, αNAA có cùng nồng độ nhưng chỉ tạo ra 4,90 rễ/mẫu. Kết quả này cũng cho thấy qui luật, khi tăng nồng độ αNAA và IBA thì số rễ tăng lên, nhưng chiều dài rễ giảm đi. Nồng độ αNAA và IBA 0 mg/l cho thấy tất cả các chồi cây đều tái sinh rễ *in vitro*, kết quả này tương đồng với kết quả của Chapla et al. (2009), Besson et al. (2010) và Stefanello et al. (2010) khi nghiên cứu tái sinh rễ *in vitro* cây *Miltonia flavescens* Lindl. không sử dụng chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm auxin. Hiện nay chưa thấy công bố nào nghiên cứu ảnh hưởng của αNAA và IBA lên quá trình tái sinh rễ *in vitro* cây hoa *Miltonia* sp., nhưng đã có nhiều nghiên cứu công bố sử dụng αNAA và IBA trong quá trình tái sinh rễ *in vitro* cây hoa đồng tiền như nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Hằng và cs. (2013).

Như vậy, kết quả thu được của thí nghiệm cho thấy, môi trường 1/2 MS có bổ sung 0,1 - 1 mg/l αNAA hoặc 0,1 - 1 mg/l IBA đều thích hợp cho quá trình tái sinh rễ *in vitro* cây hoa *Miltonia* sp.

3.6. Khảo sát ảnh hưởng của giá thể lên sự thích nghi và sinh trưởng của cây con ở giai đoạn *ex vitro*

Khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây cấy mô *Miltonia* sp. ở giai đoạn vườn ươm sau 50 ngày trồng và chăm sóc trên giá thể vụn xơ dừa và dớn được thể hiện trên Bảng 6. Kết quả thí nghiệm cho thấy, tỷ lệ sống của cây trên giá thể vụn xơ dừa đạt 90%, tỷ lệ sống của cây trên giá thể dớn là 86%. Quá trình chuyển cây con ra vườn ươm là giai đoạn quan trọng quyết sự định thành công trong vì nhân giống, cây *in vitro* nuôi cấy trên môi trường thạch và độ ẩm bão hòa, do vậy, khi chuyển cây con ra giai đoạn vườn ươm trồng trên giá thể mới chưa thích nghi và độ ẩm thấp nên cây con thường bị chết. Cây con trồng trên giá thể vụn xơ dừa có số rễ nhiều hơn nhưng không có ý nghĩa về mặt thống kê sinh học và chiều dài rễ dài hơn những cây con trồng trên giá thể dớn (Hình k1, k2). Điều này cho thấy, giá thể vụn xơ dừa xốp, mịn và giữ ẩm tốt nên thích hợp cho sự sinh trưởng của cây

Bảng 6. Ảnh hưởng của giá thể lên sự thích nghi và sinh trưởng của cây con ở giai đoạn *ex vitro*

Giá thể	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ sống (%)
Vụn xơ dừa	6,00 ^a	3,29 ^a	90
Dớn	5,60 ^a	2,70 ^b	86

Ghi chú: * Những ký tự khác nhau (a, b,...) trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy $P < 0,05$ trong phép thử T-test.

con trong giai đoạn đầu ở điều kiện vườn ươm. Kết quả này cũng tương đương với kết quả của Stefanello et al. (2009) trồng cây *Miltonia flavescens* Lindl. *in vitro* trên giá thể dớn, vụn xơ dừa, vỏ thông sau 30 ngày chăm sóc tỷ lệ sống của cây đạt 80 - 100%. Yamamoto et al. (2009) và Yamakami et al. (2009) sử dụng giá thể dớn, vụn xơ dừa, vỏ thông, trấu, than củi, rêu nước, vụn bã mía đường khi chuyển cây con *Miltonia* sp. ra giai đoạn vườn ươm.

Như vậy, giá thể vụn xơ dừa và giá thể dớn đều thích hợp chuyển cây con *Miltonia* sp. ra giai đoạn vườn ươm, nhưng giá thể vụn xơ dừa tốt hơn giá thể dớn.

4. KẾT LUẬN

Từ các kết quả thu được cho thấy, môi trường 1/2 MS bổ sung 15% nước dừa, 1,5 mg/l BA, 0,1 mg/l NAA, 30 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính, 8 g/l agar, pH 5,8 là tốt nhất cho sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây hoa *Miltonia* sp. (chiều cao chồi cây đạt 1,95cm, số chồi/mẫu là 25,60). Môi trường 1/2 MS bổ sung 0,1 - 1 mg/l NAA hoặc 0,1 - 1 mg/l IBA, 30 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính, 8 g/l agar, pH 5,8 đều thích hợp cho sự tạo rễ *in vitro* cây hoa *Miltonia* sp., với tỷ lệ tái sinh rễ 100%. Khi chuyển cây con *Miltonia* sp. ra trồng ở điều kiện vườn ươm thì giá thể vụn xơ dừa và giá thể dớn đều thích hợp cho sự sinh trưởng của cây ở giai đoạn *ex vitro*, nhưng giá thể vụn xơ dừa tốt hơn, với tỷ lệ sống đạt 90%, số lượng 6 rễ/cây, chiều dài rễ 3,29cm.



Hình 1. Nhân giống *in vitro* cây hoa *Miltonia* sp.

Ghi chú: a. *Miltonia* sp. màu đỏ; b. *Miltonia* sp. màu trắng hồng; c. Protocorms; d1, d2 và d3. Chồi cây trên môi trường MS, 1/2 MS và 1/4 MS; e1, e2, e3 và e4. Chồi cây trên môi trường 0, 5, 10 và 15% nước dừa; f1, f2, f3, f4, f5 và f6. Chồi cây trên môi trường 0, 0,5, 1, 1,5, 2 và 3 mg/l BA; g1, g2, g3 và g4. Chồi cây trên môi trường 0, 0,5, 1, và 1,5 mg/l BA kết hợp với 0,1 mg/l αNAA; h1, h2, h3 và h4. Tái sinh rễ *in vitro* trên môi trường 0, 0,1, 0,5 và 1 mg/l αNAA; i1, i2, i3, i4. Tái sinh rễ *in vitro* trên môi trường 0, 0,1, 0,5 và 1 mg/l IBA; j. Cây *Miltonia* sp. hai tháng tuổi trồng tại vườn ươm; k1, k2. Cây *Miltonia* sp. hai tháng tuổi trồng trên giá thể vụn xơ dừa và giá thể dớn; l. Cây *Miltonia* sp. ba tháng tuổi trồng vào chậu nhỏ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Besson J.C.F., Oliveira L.K. and Bonett L.P. (2010). Source and concentration of carbohydrates on shoot growth and rooting of *Miltonia flavescens* Lindl. R. Bra. Bioci., 8(1): 9 - 13.
- Chapla P.I., Besson J.C.F., Olivera L.K., Silva J.M.D., Rocha A.C.D.S. and Stefanello S. (2009). pH, activated charcoal and gelling agents of the culture medium on the *in vitro* growth of *Miltonia flavescens* Lindl. Plant Cell Cult. Micropropag., 5(2): 87 - 93.
- Duncan D. B. (1995). Multiple range and F tests. Biometrics, 11: 1 - 42.
- Hoàng Thị Kim Hồng (2011). Nghiên cứu khả năng tái sinh chồi và cụm chồi trong nuôi cấy *in vitro* cây hà thủ ô đỏ (*Polygonum multiflorum* Thunb.). Tạp chí Khoa học, Đại học Huế, 64: 23 - 32.
- Kabir M.F., Rahman M.S., Jamal A., Rahman M. and Khalekuzzaman M. (2013). Multiple shoot regeneration in *Dendrobium fimbriatum* Hook. an ornamental orchid. J. Anim. Plant Sci., 23(4): 1140 - 1145.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. Plant Physiol., 15: 473 - 497.
- Nguyễn Thị Thu Hằng, Vũ Thị Huệ và Nguyễn Như Ngọc (2013). Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy lát mỏng tế bào để nhân giống *in vitro* cây hoa đồng tiền (*Gerbera jamesonii* Bolus). Hội nghị Khoa học Công nghệ Sinh học toàn quốc 2013, tr. 792 - 796.
- Nguyễn Văn Uyên (1984). Nuôi cấy mô thực vật phục vụ công tác giống cây trồng. Nhà xuất bản thành phố Hồ Chí Minh, tr. 33.
- Phan Xuân Huyền, Nguyễn Trung Ái, Nguyễn Thị Lang, Nguyễn Thị Diệu Hương, Đinh Văn Khiêm và Dương Tấn Nhựt (2004). Phục tráng và nhân nhanh các giống Địa lan (*Cymbidium* sp.). bằng nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. Tạp chí Sinh học, 26(1): 48 - 54.
- Rao S. And Barman B. (2014). In vitro micropropagation of *Dendrobium Chrysanthum* Wall. Ex Lindl. - A Threatened Orchid. Sch. Acad. J. Biosci., 2(1): 39 - 42.
- Susumu I, Satomi H, Yasuaki H, Junzo S and Yukihiro H. (1995). Studies on the Formation of Regenerated Plants of *Codonopsis lanceolata* TRAUTV by Tissue Culture. Nat. Med., 49(1): 43 - 48.
- Stefanello S., Karsten J., Müller T.S., Tomczak A.P., Bonett L.P. and Schuelter A.R. (2009). In vitro conversion of *Miltonia flavescens* Lindl. Roots and leaf tip cells in protocorm like bodies and plant regeneration. Ciência & Agrotecnologia, Lavras, 33(1): 53 - 59.
- Sunitibala H. and Kishor R. (2009). Micropropagation of *Dendrobium transparens* L. from axenic pseudobulb segments. Ind. J. Biotechnol., 8: 448 - 452.
- Stefanello S., Silveira E.V., Oliveira L.K., Besson J.C.F. and Dutra G.M.N. (2009). Efficiency of substrates on acclimatization of *in vitro* propagated *Miltonia flavescens* Lindl.. Revista em Agronegócios e Meio Ambiente, 2(3): 467 - 476.
- Vijayakumar S., Rajalkshmi G. and Kalimuthu K. (2012). Propagation of *Dendrobium aggregatum* through the culture of immature seeds from green capsules. Lankesteriana, 12(2): 131 - 135.
- Yamakami J.K., Faria R.T. and Stenzel N.M.C. (2009). Vegetative development of *Brassacattleya pastoral* "Rosa" and *Miltonia regnellii* Rchb.f. X *Oncidium crispum* L. (Orchidaceae) in substrates alternative to xaxim (tree fern fiber). Científica, 37(1): 32 - 38.
- Yamamoto L.Y., Sorace M., Faria R.T., Takahashi L.S. and Schnitzer J.A. (2009). Alternative substrates to substitute xaxim in the cultivation of the primary hybrid *Miltonia regnellii* Rchb. f. X *Oncidium concolor* Hook. (Orchidaceae). Ciências Agrárias, 30(1): 1035 - 1042.