

NHÂN DÒNG VÔ TÍNH CÂY LAN HỒ ĐIỆP *Phalaenopsis* Sogo Yukidian

Nguyễn Thị Sơn¹, Nguyễn Quang Thạch¹, Nguyễn Thị Lý Anh¹,
Hoàng Thị Nga¹, Hoàng Thị Ánh Nguyệt²

¹*Viện Sinh học Nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam,*

²*Học viện cao học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

Email*: nguyensonbio@gmail.com

Ngày gửi bài: 16.10.2014

Ngày chấp nhận: 24.11.2014

TÓM TẮT

Lan *Phalaenopsis* Sogo Yukidian (Hồ điệp hoa trắng nhị vàng) là giống hoa đẹp được ưa chuộng và có giá trị thương mại cao trên thế giới. Việc nghiên cứu nhân giống vô tính giống lan này đã góp phần tạo ra nguồn cây giống có chất lượng tốt và đồng đều, đáp ứng nhu cầu của sản xuất. Kết quả nghiên cứu đã chỉ rõ: Nguồn vật liệu ban đầu là phát hoa với chế độ khử trùng tối ưu là khử trùng kép bằng CaOCl_2 15% trong 7 phút và Johnson 1% trong 3 phút. Môi trường tốt nhất cho sự phát sinh hình thái protocorm từ các bộ phận soma *in vitro* là MS + 2,0 mg/l BA + 6 g/l agar. Môi trường MS + 0,5 mg/l BA + 0,5 mg/l α -NAA + 6 g/l agar là môi trường tạo chồi tốt nhất. Chồi lan có tốc độ lớn nhanh nhất trên môi trường MS bổ sung 10% nước dừa (ND). Môi trường MS + 10% ND + 3,0 mg/l BA + 6 g/l agar là môi trường tối ưu để nhân nhanh chồi lan với HSN chồi cao nhất là 4,20 lần sau 6 tuần nuôi cấy. Môi trường MS + 10% ND + 0,5 g/l THT + 6 g/l agar là môi trường thích hợp nhất để tạo cây hoàn chỉnh từ chồi.

Từ khóa: Nhân nhanh, *Phalaenopsis* Sogo Yukidian, protocorm, phát hoa.

Vegetative Propagation of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian**ABSTRACT**

Phalaenopsis Sogo Yukidian is a beautiful, lovely and high value orchid in the world and also in Vietnam. An *in vitro* culture protocol for rapid propagation was established to multiply this valuable flower. Nodal buds of inflorescence of *Phalaenopsis* Sogo Yukidian were used as initial materials. Optimal sterilization treatment was obtained with CaOCl_2 15% for 7 min and then with Presept (Johnson and Johnson) 1% for 3 min. The optimal medium for protocorm regeneration was MS + 2.0 mg/l BA + 6g/l agar. The optimal medium for shoot induction was MS + 0.5mg/l BA + 0.5mg/l α NAA + 6g/l agar. Shoots grew fastest on MS medium supplemented with 10% coconut water. MS medium supplemented with 10% coconut water + 3.0mg/l BA + 6g/l agar was the best medium for shoot multiplication with the multiplication rate of 4.20 times after 6 weeks. MS medium supplemented with 10% coconut water + 0.5 g/l activate charcoal + 6g/l agar was the suitable for rooting.

Keywords: Nodal bud, *Phalaenopsis* Sogo Yukidian, propagations, protocorms.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan Hồ điệp (*Phalaenopsis*) đem lại hiệu quả kinh tế cao ở cả dạng hoa cắt cành và hoa trồng chậu. Do màu sắc đẹp, độ bền cao và khả năng thích ứng trong điều kiện phòng, lan *Phalaenopsis* trở thành giống lan phổ biến nhất trong công nghiệp sản xuất hoa (Griesbach, 2002). Cùng với sự phát triển của ngành trồng lan trong thời gian qua, loài hoa quý này không chỉ làm đẹp hơn hình

ảnh của Việt Nam trong con mắt du khách đến với đất nước xứ sở nhiệt đới mà còn mang lại hiệu quả kinh tế cao. Trồng và kinh doanh hoa lan trên thế giới đã phát triển một cách mạnh mẽ và trở thành một ngành thương mại. Có nhiều nước và khu vực đã thành công với công nghệ trồng hoa lan Hồ điệp (*Phalaenopsis*) xuất khẩu như: Thái Lan, Đài Loan, Trung Quốc.

Theo thống kê của Trung tâm Nghiên cứu Hoa, Cây cảnh - Viện Nghiên cứu Rau quả, từ

năm 2008 trở về đây quy mô sản xuất lan Hồ điệp thương mại đã tăng lên đáng kể và tăng dần đều qua các năm cả về diện tích, số lượng, cũng như mức độ đầu tư: Diện tích toàn miền Bắc trước năm 2005 là 1.200m² và 23.000 cây, năm 2012 diện tích toàn miền đã tăng lên 24.100m² và 333.000 cây. Tuy thế lượng cung vẫn không đủ cầu và vẫn phải nhập 230.000 cây từ Trung Quốc và Đài Loan. Nhu cầu cây giống và cây lan thương mại của Việt Nam cao như vậy nhưng thực tế về phương thức sản xuất hoa lan Hồ điệp ở miền Bắc Việt Nam chủ yếu vẫn là hình thức đi nhập cây con, cây nhỡ và cây đã có ngồng về chờ hoa nở để tiêu thụ. Từ năm 2008, hình thức nhập cây giống về để sản xuất tăng dần từ 2008-2012. Số lượng nhập cây nhỡ giảm đi nhưng số lượng nhập cây ngồng vẫn cao. Như vậy, việc sản xuất giống ở Việt Nam còn rất hạn chế, không chủ động nguồn giống trong sản xuất cả về số lượng cũng như chủng loại. Để sản xuất lan Hồ điệp theo quy mô công nghiệp, bắt buộc phải nhân giống bằng con đường vô tính thông qua nuôi cấy mô như các quốc gia trên thế giới áp dụng. Đã có nhiều tác giả thành công trong nhân giống vô tính lan Hồ điệp thông qua các bộ phận soma như: Tanaka (1990) đã hệ thống được phương pháp nhân nhanh *Phalaenopsis* qua nuôi cấy mô lá bằng cách tái sinh chồi non qua phát hoa, lá chồi non được cắt nuôi cấy đặt trong tối 2 tuần và kế đó đưa ra ánh sáng tạo protocorm. Zhang và cs. (2004) đã nuôi cấy lá tạo protocorm ở lan *Phalaenopsis*; Park và cs. (2001) nhân nhanh *Phalaenopsis* từ mô lá có nguồn gốc từ các cuống hoa được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung BA. Một số loài *Phalaenopsis* có thể hình thành cây con từ chóp rễ (Sagawa and Kunasaki, 1982; Arditti and Ernst, 1993; Ichihashi, 1996).

Trong thực tế hiện nay ở Việt Nam, hầu như các phòng thí nghiệm, các Viện nghiên cứu và các công ty sản xuất thương mại lan Hồ điệp nhân giống bằng phương pháp gieo hạt trong môi trường dinh dưỡng nên cây giống tạo ra có sự phân ly, dẫn đến không có cây giống chuẩn và sản phẩm không thương mại hóa được. Xuất phát từ những yêu cầu thực tiễn trên, việc thực hiện nghiên cứu này là rất có ý nghĩa nhằm góp phần tạo ra được giống lan có chất lượng tốt và đồng đều, đáp ứng nhu cầu của thị trường.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Giống lan Hồ điệp hoa trắng nhị vàng V3 (*Phalaenopsis Sogo* Yukidian) do Viện Nghiên cứu Rau quả cung cấp. Sử dụng lá, đầu rễ, phát hoa của cây *in vivo* và lá, đầu rễ, protocorm, cụm chồi và chồi lan *in vitro*.

2.2. Phương pháp

Các thí nghiệm sử dụng phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật (Gamborg and Phillips, 1995). Môi trường sử dụng trong thí nghiệm là Vacin & Went (1949), Murashige & Shoo (1962), 6,2 g/l agar, 20 g/l saccarose và 100mg/l inositol), dịch nghiền: Nước dừa (ND) và chất điều tiết sinh trưởng tùy từng giai đoạn thí nghiệm, pH môi trường là 5,8. Môi trường nuôi cấy được hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút ở áp suất 1atm. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên CRD, 3 lần nhắc lại. Mỗi lần nhắc lại 10 mẫu/công thức được đo đếm và quan sát định kỳ 2 tuần/lần.

Nghiên cứu tạo nguồn vật liệu ban đầu từ các bộ phận soma (lá, đầu rễ và phát hoa) của cây mẹ *in vivo*; nuôi cấy khởi động và thăm dò khả năng phát sinh hình thái của các bộ phận soma trên các nền môi trường MS, 1/2MS, V&W và 1/2V&W ở các trạng thái môi trường đặc và lỏng; tạo vật liệu nhân nhanh từ nguồn mô soma của cây *in vitro* tạo ra từ phát hoa trên nền môi trường MS có bổ sung riêng rẽ các chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm Cytokinin (Kinetin, BA) ở các nồng độ khác nhau; tạo chồi từ protocorm trên nền môi trường MS kết hợp với tổ hợp BA và α NAA; nhân nhanh chồi trên nền môi trường MS có bổ sung nước dừa, BA ở các nồng độ khác nhau và tạo cây hoàn chỉnh cho các chồi thu được từ thí nghiệm trên với môi trường có bổ sung than hoạt tính.

Các chỉ tiêu theo dõi được tiến hành theo phương pháp nghiên cứu nông sinh học thông dụng: Tỷ lệ mẫu sạch và sống, đường hướng phát sinh hình thái (protocorm hay chồi), hệ số nhân, số lá, chiều dài lá, hình thái chồi, số rễ, chiều dài rễ.



Hình 1. Lan *Phal. Sogo Yukidian*

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được phân tích phương sai (ANOVA) một nhân tố, phân tích hậu kiểm Fisher's PLSD với mức $P \leq 0,05$ bằng phần mềm Microsoft Excel, IRRISTAT 4.0 và SPSS 11.5.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khử trùng tạo nguồn vật liệu ban đầu

Somaclone là phương pháp nhân giống *in vitro* sử dụng các bộ phận soma của cây mẹ làm vật liệu khởi đầu có ưu điểm cây con vẫn giữ được đặc tính di truyền của cây mẹ (tạo dòng vô tính), phương pháp này đặc biệt quan trọng đối với các giống hoa có giá trị thương mại cao được thị trường ưa chuộng. Tuy nhiên, mẫu được lấy ngoài tự nhiên nên cần phải khử trùng đảm bảo cho mẫu đưa vào nuôi cấy sạch, có khả năng phát sinh hình thái.

Tiến hành khử trùng các bộ phận soma khác nhau của cây *in vivo* và cấy vào môi trường thông thường sử dụng để nuôi cấy lan là VW thu được các kết quả sau:

Các công thức thí nghiệm nghiên cứu chế độ khử trùng phát hoa đã tiến hành cho kết quả rất tốt. 100% các công thức khử trùng đều có mẫu sống. Ở các công thức CT3 (khử trùng bằng CaOCl_2 15% trong 10 phút) cho tỷ lệ mẫu sống thấp nhất là 40%, tiếp đến là CT4 (CaOCl_2 15% trong 15 phút), tỷ lệ mẫu sống 53,33%. Chất khử trùng Johnson 1% tỏ ra ưu thế hơn CaOCl_2 15% có tỷ lệ sống cao hơn và lần lượt đạt 66,67% (CT1) và 76,67% (CT2). Với mảnh lá *in vivo* cả 6 công thức đều cho kết quả tối ưu như nhau 100% các mẫu cấy đều sạch và sống. Các công thức khử trùng đầu rễ *in vivo* đều có mẫu sống nhưng tỷ lệ không cao từ 6,66% đến 30,00%, thấp hơn rất nhiều so với mẫu lá non *in vivo*. Vậy để tạo nguồn vật liệu ban đầu chúng tôi chọn phương pháp khử trùng kép bằng dung dịch khử trùng CaOCl_2 15% trong 7 phút + Johnson 1% trong 3 phút là phương pháp khử trùng tốt nhất cho cả 3 bộ phận soma là: phát hoa đạt tỷ lệ mẫu sạch và sống đạt 93,33%; lá non *in vivo* tỷ lệ mẫu sạch và sống đạt 100%; đầu rễ *in vivo* tỷ lệ mẫu sạch và sống đạt 30%.

3.2. Nuôi cấy khởi động và thăm dò khả năng phát sinh hình thái của các bộ phận soma

Ở nội dung trên chúng tôi đã xác định được chế độ khử trùng tối ưu và nguồn vật liệu ban

Bảng 1. Ảnh hưởng của phương pháp khử trùng đến tỷ lệ mẫu sạch và sống sau 4 tuần nuôi cấy)

CTTN	Σ mẫu cấy	Số mẫu sạch và sống			Tỷ lệ mẫu sạch và sống (%)		
		Ngòong hoa	Lá <i>in vivo</i>	Đầu rễ <i>in vivo</i>	Ngòong hoa	Lá <i>in vivo</i>	Đầu rễ <i>in vivo</i>
CT1: Johnson 1% 7 phút	30	20	20	3	66,67	100	10,00
CT2: Johnson 1% 10 phút	30	23	23	5	76,67	100	16,66
CT3: CaOCl_2 15% 10 phút	30	12	12	2	40,00	100	6,66
CT4: CaOCl_2 15% 15 phút	30	16	16	5	53,33	100	16,66
CT5: CaOCl_2 15% 7 phút + Johnson 1% 5 phút	30	27	27	7	90,00	100	23,33
CT6: CaOCl_2 15% 7 phút + Johnson 1% 3 phút	30	28	28	9	93,33	100	30,00

đầu đưa vào nuôi cấy mô cho giống lan nghiên cứu. Sự phát sinh hình thái có gì khác nhau không khi sử dụng nguồn vật liệu soma *in vivo* hoặc soma *in vitro* đưa vào nuôi cấy khởi động. Chính vì vậy, bước tiếp theo chúng tôi tiến hành thí nghiệm nghiên cứu nuôi cấy khởi động và thăm dò khả năng phát sinh hình thái của mẫu cấy từ các bộ phận soma *in vivo* và *in vitro*. Zhang và cs. (2004), Park và cs. (2001) đã nuôi cấy lá tạo protocorm ở lan Hồ điệp; Polonca và cs. (2004) tái sinh trực tiếp chồi từ phát hoa; Sagawa và Kunasaki (1982), Arditti và Ernst (1993), Ichihashi (1997) nuôi cấy đầu rễ trên môi trường MS + 2 mg/l BA để tái sinh chồi hoặc protocorm đạt hiệu quả cao trên các giống lan *Phalaenopsis* khác nhau. Ở nội dung này, chúng tôi tiến hành thí nghiệm cấy phát hoa, đầu rễ và lá non *in vivo*, *in vitro* của giống lan nghiên cứu và cấy trên nền môi trường MS + 2 mg BA/lít môi trường và để trong điều kiện che tối hoàn toàn.

3.2.1. Sự phát sinh hình thái của các bộ phận soma khác nhau từ cây *in vivo*

Kết quả bảng 2 cho thấy không thể sử dụng vật liệu ban đầu từ lá *in vivo* và đầu rễ *in vivo* của giống lan nghiên cứu (100% mẫu cấy không phát sinh hình thái) mà phải sử dụng phát hoa

để tạo chồi (90% mẫu cấy phát sinh chồi) làm nguồn vật liệu ban đầu.

3.2.2. Thăm dò khả năng phát sinh hình thái của mô soma nuôi cấy từ vật liệu khác nhau

Mảnh lá và đầu rễ *in vivo* khó phát sinh hình thái trong nuôi cấy khởi động. Có gì khác không nếu chúng tôi sử dụng nguồn vật liệu là mảnh lá và đầu rễ *in vitro*? Tiến hành thăm dò khả năng phát sinh hình thái của hai nguồn vật liệu *in vivo* và *in vitro* nhằm tìm được vật liệu tối ưu cho sự phát sinh hình thái trong nuôi cấy khởi động của giống lan nghiên cứu. Sau 8 tuần nuôi cấy và theo dõi, kết quả thu được như sau:

Kết quả ở bảng 3 cho thấy mảnh lá và đầu rễ *in vivo* không phát sinh hình thái còn mảnh lá và đầu rễ *in vitro* có khả năng phát sinh protocorm (tỷ lệ phát sinh protocorm ở lá là 56,67%, còn đầu rễ là 6,67%). Đây là minh chứng thêm cho giống lan nghiên cứu không thể phát sinh hình thái từ bộ phận soma là lá và đầu rễ *in vivo*, chỉ phát hoa là phát sinh chồi. Như vậy, trong nuôi cấy khởi động không sử dụng nguồn vật liệu soma *in vivo* từ lá và đầu rễ mà sử dụng vật liệu là phát hoa (có khả năng phát sinh chồi đạt tỷ lệ 90% sau 8 tuần nuôi cấy).

Bảng 2. Sự phát sinh hình thái của các bộ phận soma khác nhau từ cây *in vivo* (sau 8 tuần)

CTTN	Tổng số mẫu cấy	Số mẫu tái sinh	Đường hướng phát sinh hình thái (%)	
			Protocorm	Chồi
CT1: Mất ngủ phát hoa	30	27	0	90,00
CT2: Mảnh lá <i>in vivo</i>	30	0	0	0
CT3: Đầu rễ <i>in vivo</i>	30	0	0	0

Bảng 3. Thăm dò khả năng phát sinh hình thái của mô soma nuôi cấy từ vật liệu khác nhau (sau 8 tuần)

CTTN	Tổng số mẫu cấy	Số mẫu tái sinh	Đường hướng phát sinh hình thái (%)	
			Protocorm	Chồi
CT1: Mảnh lá <i>in vivo</i>	30	0	0	0
CT2: Mảnh lá <i>in vitro</i>	30	17	56,67	0
CT3: Đầu rễ <i>in vivo</i>	30	0	0	0
CT4: Đầu rễ <i>in vitro</i>	30	8	6,67	0

3.2.3. Ảnh hưởng của môi trường và trạng thái môi trường đến sự phát sinh hình thái của phát hoa

Có nhiều loại môi trường khoáng dùng trong nuôi cấy mô nhưng trong đó chúng tôi tiến hành nghiên cứu trên các nền môi trường được cho là thích hợp với các loài phong lan nói chung như: MS (Murashige & Shoog, 1962); 1/2MS; VW (Vacin & Went, 1949); 1/2VW. Nguồn vật liệu ban đầu được xác định cho các thí nghiệm tiếp theo là mắt ngủ phát hoa, trong thí nghiệm này chúng tôi cấy mẫu trong 8 môi trường có thành phần và trạng thái khác nhau. Sau 4 tuần nuôi cấy, theo dõi chúng tôi thu được kết quả ở bảng 4.

Kết quả bảng 4 và hình 2 cho thấy các mẫu cấy đều không phát sinh protocorm mà phát sinh chồi, CT4 và CT8 không phát sinh hình thái. Các công thức còn lại tỷ lệ phát sinh chồi từ 30 - 100%, trong đó các môi trường đặc chiếm ưu thế hơn, cho tỷ lệ phát sinh chồi cao hơn. Như vậy, môi trường MS đặc (môi trường có bổ

sung 6,0g agar) được lựa chọn trong nuôi cấy phát sinh chồi ở giống lan *Phal. Sogo Yukidian* (tỷ lệ phát sinh chồi là 100%).

3.3. Tạo vật liệu nhân nhanh từ nguồn mô soma của cây *in vitro* tạo ra từ phát hoa

3.3.1. Ảnh hưởng của Kinetine đến sự phát sinh hình thái từ cơ quan soma *in vitro*

Kinetine (KIN) có vai trò kích thích phân chia tế bào mạnh mẽ. Vì vậy người ta xem chúng như là các chất hoạt hóa sự phân chia tế bào. Với những chồi thu được từ các thí nghiệm trước chúng tôi sử dụng mảnh lá *in vitro*, đầu rễ *in vitro* tiến hành thí nghiệm nghiên cứu sự ảnh hưởng của KIN đến sự phát sinh hình thái từ mảnh lá *in vitro*. Qua theo dõi 12 tuần cho bảng kết quả sau:

Từ kết quả trên bảng 5 cho thấy KIN có ảnh hưởng không rõ rệt lên sự phát sinh hình thái của mẫu lá *in vitro*. Ở nồng độ thấp thì mảnh lá

Bảng 4. Ảnh hưởng của môi trường và trạng thái môi trường đến sự phát sinh hình thái của phát hoa (sau 4 tuần)

CTTN	Tổng số mẫu cấy	Số mẫu sống	Đường hướng của sự phát sinh hình thái (%)	
			Protocorm	Chồi
CT1: MS đặc	30	30	0	100,00
CT2: MS lỏng lác	30	30	0	43,33
CT3: ½ MS đặc	30	30	0	80,00
CT4: ½ MS lỏng lác	30	30	0	0
CT5: V&W đặc	30	30	0	66,67
CT6: V&W lỏng lác	30	30	0	30,00
CT7: ½ V&W đặc	30	30	0	40,00
CT8: ½ V&W lỏng lác	30	30	0	0



Hình 2. Ảnh hưởng của môi trường và trạng thái môi trường đến sự phát sinh hình thái của mẫu cấy (sau 4 tuần)

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của Kinetine (KIN) đến sự phát sinh hình thái từ mảnh lá và đầu rễ của cây *in vitro* (sau 12 tuần nuôi cấy)

CTTN	Tổng mẫu cây	Mảnh lá				Đầu rễ			
		Số mẫu sống và phát sinh hình thái	Đường hướng của sự phát sinh hình thái (%)		Hệ số nhân (lần)	Số mẫu sống và phát sinh hình thái	Đường hướng của sự phát sinh hình thái (%)		Hệ số nhân (lần)
			Protocorm	Chồi			Protocorm	Chồi	
CT1 (ĐC): MS	90	0	0	0	-	0	0	0	-
CT2: MS +0,2 mg/l KIN	90	0	0	0	-	0	0	0	-
CT3: MS +0,5 mg/l KIN	90	0	0	0	-	0	0	0	-
CT4: MS +1,0 mg/l KIN	90	9	10,0	0	2,44	1	3,33	0	2,00
CT5: MS +2,0 mg/l KIN	90	15	16,67	0	3,33	2	6,67	0	2,50
CT6: MS +3,0 mg/l KIN	90	12	13,33	0	1,33	1	3,33	0	1,00
<i>LSD</i> _{0,05}					0,2				0,17
CV%					3,4				3,6

in vitro không phát sinh hình thái, khi tăng nồng độ lên 1,0; 2,0 mg/l và 3,0 mg/l thì thấy có sự hình thành protocorm nhưng tỷ lệ không cao, hệ số nhân thấp. Với nồng độ KIN 2,0 mg/l cho kết quả tốt nhất có ý nghĩa với hệ số nhân là 3,33 lần. Đối với đầu rễ thì tỷ lệ phát sinh protocorm thấp hơn so với ở lá *in vitro* nhưng vẫn có phát sinh protocorm ở nồng độ 1,0; 2,0 và 3,0 mg/l. Nồng độ tốt nhất để hình thành protocorm là 2,0 mg/l với hệ số nhân là 2,50.

Điều này cũng đúng với các nghiên cứu của Sagawa và Kunasaki (1982), Arditti và Ernst (1993), Ichihashi (1996) khi tái sinh protocorm từ đầu rễ của một số loài lan *Phalaenopsis*.

3.3.2. Ảnh hưởng của BA đến sự phát sinh hình thái từ cơ quan soma *in vitro*

Kết quả bảng 6 cho thấy việc bổ sung BA vào môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến khả năng phát sinh hình thái của mẫu lá và đầu rễ

Bảng 6. Ảnh hưởng của BA đến sự phát sinh hình thái từ mảnh lá và đầu rễ của cây *in vitro* (sau 12 tuần)

CTTN	Tổng mẫu cây	Mảnh lá				Đầu rễ			
		Số mẫu sống và phát sinh hình thái	Đường hướng của sự phát sinh hình thái (%)		Hệ số nhân (lần)	Số mẫu sống và phát sinh hình thái	Đường hướng của sự phát sinh hình thái (%)		Hệ số nhân (lần)
			Protocorm	Chồi			Protocorm	Chồi	
CT1 (ĐC): MS	90	0	0	0	-	0	0	0	-
CT2: MS + 0,2 mg/l BA	90	0	0	0	-	0	0	0	-
CT3: MS + 0,5 mg/l BA	90	11	12,22	0	1,09	5	5,67	0	2,00
CT4: MS + 1,0 mg/l BA	90	17	18,89	0	3,11	14	15,56	0	3,28
CT5: MS + 2,0 mg/l BA	90	50	55,55	0	5,23	26	28,89	0	4,10
CT6: MS + 3,0 mg/l BA	90	19	21,11	0	3,87	16	17,78	0	3,38
<i>LSD</i> _{0,05}					0,21				0,22
CV%					3,2				3,5



Hình 3. Ảnh hưởng của BA đến sự phát sinh hình thái từ mảnh lá của cây *in vitro* (sau 12 tuần nuôi cấy)

in vitro theo hướng phát sinh protocorm. Khi bổ sung hàm lượng BA từ 0,5 mg/l môi trường đến 2,0 mg/l thì hệ số nhân tăng từ 1,09-5,23 lần. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng hàm lượng BA trong môi trường thì số lượng protocorm và hệ số nhân (HSN) lại có xu hướng giảm. Ở độ tin cậy 95%, nghiệm thức 5 là nghiệm thức tối ưu có HSN là 5,23, cao nhất và cao hơn hẳn các công thức khác sau 12 tuần nuôi cấy. Vậy việc bổ sung hàm lượng BA trong môi trường nuôi cấy mẫu lá của cây *in vitro* lan *Phal.* Sogo Yukidian là rất có ý nghĩa. Ở đầu rễ *in vitro* sự phát sinh hình protocorm cao nhất khi nuôi cấy trên môi trường bổ sung 2,0 mg/l BA cho HSN là 4,10 lần. Tanaka và cs. (1976) đã nhân giống *Phal. amabilis* từ hạt 194 và 349 ngày tuổi, sau đó tách đỉnh rễ và nuôi cấy đỉnh rễ trên môi trường MS tạo protocorm sau 120-272 ngày nuôi cấy. Mảnh rễ tạo mô sẹo xốp, mô sẹo xốp được tách rời và nuôi cấy trên môi trường tạo 12 protocorm. Như vậy, lan *Phal.* Sogo Yukidian cho kết quả cao hơn.

3.4. Tạo chồi từ protocorm và nhân nhanh chồi

3.4.1. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và α -NAA tới khả năng tạo chồi từ protocorm

Khi nghiên cứu ảnh hưởng riêng rẽ của các chất điều hòa sinh trưởng tới sự phát sinh hình thái từ cơ quan soma của giống lan nghiên cứu thu được protocorm hoặc không tùy vào loại chất điều hòa, giai đoạn quan trọng tiếp theo trong khâu nhân nhanh là tạo chồi. Sự cân bằng hàm lượng auxin và xytokinin trong môi trường nuôi cấy quyết định sự phát sinh chồi hay rễ,

chính vì vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của các tổ hợp chất điều tiết sinh trưởng BA và α NAA tới khả năng tạo chồi từ protocorm. Kết quả thí nghiệm được trình bày trên bảng 7.

Kết quả bảng 7 cho thấy, khả năng tạo chồi của tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng là tương đối ổn định. Tỷ lệ tạo chồi phụ thuộc vào nồng độ của các chất có trong môi trường. Tỷ lệ tạo chồi cao nhất là 80% ở CT6 (0,5 mg/l BA + 0,5 mg/l NAA) với hệ số nhân là 12,5 lần. Tuy nhiên, nếu tăng nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng lên thì tỷ lệ tạo chồi lại giảm đi. Ở độ tin cậy 95% thì CT6 có số mẫu tạo chồi, hệ số nhân chồi đạt cao nhất so với các nghiệm thức còn lại. Vậy môi trường MS + 0,5 mg/l BA + 0,5 mg/l α NAA được chọn làm môi trường tạo chồi từ protocorm giống lan nghiên cứu.

3.4.2. Ảnh hưởng của nước dừa (ND) đến tốc độ nuôi lớn chồi lan Hồ điệp.

Trong nuôi cấy lan, việc sử dụng chất điều hòa sinh trưởng cũng có hạn chế là tạo ra biến dị dẫn tới dòng thu được không đồng nhất. Sử dụng các dịch chiết tự nhiên như nước dừa cho nhiều kết quả khả quan trong nhiều giai đoạn của nuôi cấy mô do trong nước dừa có chứa rất nhiều chất như acid amin, vitamin, acid hữu cơ, acid nucleic, đường, khoáng chất, hormon thực vật, một số chất khác giúp mô sinh trưởng và phát triển nhanh hơn (Shekarriz et al., 2014). Để xác định liều lượng nước dừa thích hợp cho sự sinh trưởng của chồi lan nghiên cứu, chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm và thu được kết quả như sau:

Bảng 7. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và α NAA tới khả năng tạo chồi từ protocorm (sau 8 tuần)

CTTN	Tổng mẫu cấy (protocorm)	Số mẫu tạo chồi	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Hệ số nhân (lần)
CT1 (ĐC): Môi trường MS	30	8	26,67	3,75
CT2: ĐC + 0,2 mg/l BA + 0,2 mg/l α NAA	30	9	30,00	4,00
CT3: ĐC + 0,2 mg/l BA + 0,5 mg/l α NAA	30	12	40,00	4,58
CT4: ĐC + 0,2 mg/l BA + 1,0 mg/l α NAA	30	19	63,33	7,52
CT5: ĐC + 0,5 mg/l BA + 0,2 mg/l α NAA	30	16	53,33	5,56
CT6: ĐC + 0,5 mg/l BA + 0,5 mg/l α NAA	30	24	80,00	12,50
CT7: ĐC + 0,5 mg/l BA + 1,0 mg/l α NAA	30	11	36,67	5,27
CT8: ĐC + 1,0 mg/l BA + 0,2 mg/l α NAA	30	6	20,00	3,33
CT9: ĐC + 1,0 mg/l BA + 0,5 mg/l α NAA	30	4	13,33	3,75
CT10: ĐC + 1,0 mg/l BA + 1,0 mg/l α NAA	30	3	10,00	2,33
<i>LSD</i> _{0,05}		0,67		0,31
CV%		3,5		3,5

Bảng 8. Ảnh hưởng của nước dừa đến tốc độ nuôi lớn chồi lan Hồ điệp (sau 8 tuần)

CTTN	Số lá TB/chồi (lá)	Chiều dài lá TB (cm)
CT1 (ĐC): Môi trường MS	2,27	1,40
CT2: ĐC + 5% ND	3,10	1,60
CT3: ĐC + 10% ND	3,63	2,70
CT4: ĐC + 15% ND	3,30	2,30
CT5: ĐC + 20% ND	3,27	2,10
<i>LSD</i> _{0,05}	0,15	0,92
CV%	2,7	2,5



Hình 4. Ảnh hưởng của nước dừa đến tốc độ nuôi lớn chồi lan Hồ điệp (sau 8 tuần)

Kết quả bảng 8 cho thấy, khi môi trường không bổ sung ND (CT1), các chỉ tiêu số lá TB (trung bình)/chồi và chiều dài lá TB chỉ đạt lần lượt là 2,27 lá và 1,4cm. Khi bổ sung ND với các nồng độ 5% (CT2), các chỉ tiêu số lá và chiều lá

đã tăng rõ rệt với kết quả là 3,1 lá; 1,6cm. Tốc độ lớn của chồi lan nhanh nhất khi môi trường có bổ sung 10% ND, thể hiện ở chỉ số số lá TB/chồi là cao nhất (3,63 lá/chồi) và chiều dài lá TB là 2,7cm. Khi tăng nước dừa lên đến nồng độ

15%, 20%, các chỉ tiêu về số lá và chiều dài lá TB cao hơn CT1 (ĐC) nhưng vẫn thấp hơn CT3 ở mức có ý nghĩa, đúng với nghiên cứu của Parisa (2014) khi bổ sung nước dừa để làm tăng khả năng nhân nhanh giống lan *Phalaenopsis* lai. Vậy môi trường MS + 10% ND là thích hợp nhất cho nuôi lớn chồi nghiên cứu.

3.4.3. Ảnh hưởng của BA đến khả năng nhân nhanh chồi

Lan Hồ điệp là loài đơn thân, vì vậy việc tạo cụm chồi gặp nhiều khó khăn trong công tác nhân nhanh. Bằng phương pháp kích thích các mắt ngủ trên cây, một số tác giả trên thế giới đã thành công trong việc tạo chồi lan Hồ điệp *in vitro*. Tuy nhiên, ngay cả đối với cây Hồ điệp đã trưởng thành, đoạn thân của cây rất nhỏ, cây

chỉ có từ 3-4 lá. Vì vậy, số lượng mắt ngủ trên cây ít, rất khó cho công tác kích thích các mắt ngủ trên cây. Chồi lan sau khi thu được ở các thí nghiệm trước sẽ được cấy vào các môi trường MS có bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau, kết quả thu được như sau:

Kết quả thí nghiệm cho thấy BA có tác dụng rất tốt đến khả năng nhân nhanh chồi, số chồi tăng lên khi môi trường bổ sung BA có nồng độ tăng lên từ 1-3 mg/l. Nồng độ BA là 3 mg/l cho hệ số nhân chồi là cao nhất (4,2 lần). Khi nồng độ BA tiếp tục tăng, số chồi tạo thành có xu hướng giảm đi song vẫn cao hơn rất nhiều so với môi trường đối chứng. Điều này chứng tỏ sử dụng BA với nồng độ thích hợp sẽ cho hiệu quả nhân nhanh chồi.

Bảng 9. Ảnh hưởng của BA đến khả năng nhân nhanh chồi (sau 6 tuần)

CTTN	Tổng mẫu cấy (chồi)	Số lá TB ban đầu	Kết quả sau 6 tuần		Hình thái chồi
			Tổng chồi thu được	Hệ số nhân chồi (lần)	
CT1 (ĐC): Môi trường MS +10% ND	90	6	90	1	+++
CT2: ĐC + 1,0 mg/l BA	90	6	162	1,8	+++
CT3: ĐC + 2,0 mg/l BA	90	6	201	2,23	+++
CT4: ĐC + 3,0 mg/l BA	90	6	378	4,20	+++
CT5: ĐC + 4,0 mg/l BA	90	6	336	3,73	+
CT6: ĐC + 5,0 mg/l BA	90	6	294	3,27	+
<i>LSD</i> _{0,05}			13,87	0,15	
<i>CV</i> %			3,2	3,2	

Ghi chú: +++ chồi màu xanh đậm, + chồi xanh nhạt và xuất hiện biến dị



Hình 5. Ảnh hưởng của BA đến khả năng nhân nhanh chồi (sau 6 tuần nuôi cấy)

3.5. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng ra rễ và tạo cây hoàn chỉnh

Mẫu cấy của lan thường tiết ra phenol làm môi trường hóa nâu, không những vậy các sản phẩm của quá trình trao đổi chất trong cây khi tiết ra môi trường cũng ảnh hưởng tới sức sống của mẫu cấy cũng như khả năng ra rễ của chồi. Than hoạt tính (THT) có tác dụng hấp thu một số chất không có lợi cho sự phát triển của cây như các chất sản sinh ra trong quá trình khử trùng hoặc một số phenol do cây trồng tiết ra. Bổ sung thêm THT vào môi trường có thể có lợi cho việc hình thành rễ của cây do THT có tác dụng hạn chế mức độ chiếu sáng và nó có khả năng hấp thụ các chất ức chế sự ra rễ trong môi trường nuôi cấy (George and Sherrington, 1984). Kết quả nghiên cứu trên giống lan này được trình bày ở bảng 10.

Môi trường không bổ sung THT cho tỷ lệ ra rễ rất thấp, trung bình 0,9 rễ/chồi. Như vậy, khó có thể tạo cây hoàn chỉnh. Khi bổ sung THT với hàm lượng tăng dần thì khả năng ra rễ cũng tăng dần, chứng tỏ THT có ảnh hưởng tới khả

năng ra rễ của chồi lan. Hàm lượng THT tối ưu cho sự ra rễ là 0,5 g/l cho số rễ trung bình trên cây cao nhất là 2,92, khi tăng hàm lượng THT cao hơn nữa, số rễ có xu hướng giảm đi.

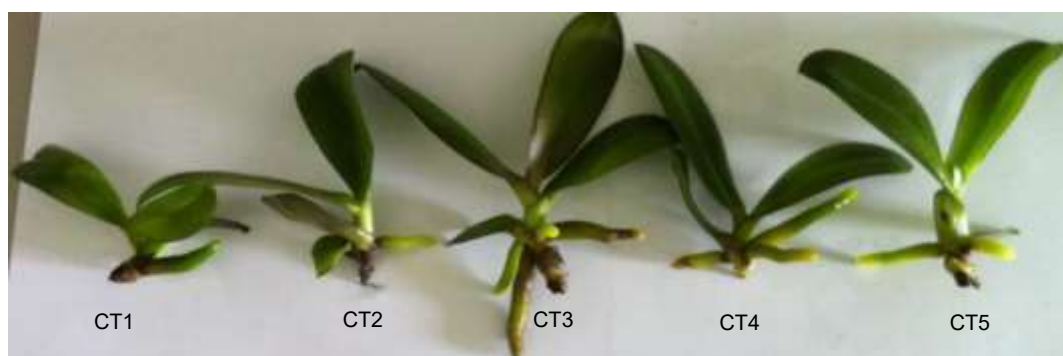
4. KẾT LUẬN

- Nguồn vật liệu ban đầu là phát hoa với chế độ khử trùng tối ưu là phương pháp khử trùng kép bằng dung dịch khử trùng CaOCl_2 15% 7 phút và Johnson 1% 3 phút cho cả 3 bộ phận soma là: phát hoa đạt tỷ lệ mẫu sạch và sống đạt 93,33%; lá non *in vivo* tỷ lệ mẫu sạch và sống đạt 100%; đầu rễ *in vivo* tỷ lệ mẫu sạch và sống đạt 30% sau 4 tuần nuôi cấy.

- Môi trường tốt nhất cho sự phát sinh hình thái protocorm từ các bộ phận soma *in vitro* sau 6 tuần là MS + 2,0 mg/l BA cho sự phát sinh hình thái từ mảnh lá *in vitro* với tỷ lệ phát sinh protocorm đạt cao nhất là 55,55% và hệ số nhân protocorm là 5,23 lần; đầu rễ *in vitro* với tỷ lệ phát sinh protocorm đạt cao nhất là 28,89% và hệ số nhân protocorm là 4,1 lần.

Bảng 10. Ảnh hưởng của THT đến khả năng ra rễ của chồi lan (sau 6 tuần nuôi cấy)

CTTN	Tỷ lệ chồi tạo rễ (%)	Số rễ TB/cây (rễ)	Chiều dài rễ TB (cm)
CT1 (ĐC): Môi trường MS + 10% ND	81,11	0,90	1,37
CT2: ĐC + 0,3 g/l THT	88,89	1,38	1,65
CT3: ĐC + 0,5 g/l THT	100	2,92	2,87
CT4: ĐC + 0,7 g/l THT	100	2,09	2,66
CT5: ĐC + 1,0 g/l THT	100	1,83	2,36
$LSD_{0,05}$		0,10	0,11
CV%		3,1	2,9



Hình 6. Ảnh hưởng của THT đến khả năng ra rễ của chồi lan (sau 6 tuần nuôi cấy)

- Môi trường MS + 0,5 mg/l BA + 0,5 mg/l α NAA là môi trường tạo chồi tốt nhất với tỷ lệ tạo chồi là 80% và HSN chồi là 12,5 lần sau 8 tuần nuôi cấy.

- Môi trường MS + 10% ND + 3,0 mg/l BA là môi trường tối ưu để nhân nhanh chồi lan, với HSN chồi là cao nhất 4,20 lần sau 6 tuần nuôi cấy.

- Môi trường MS có bổ sung 10% ND và 0,5 g/l THT là môi trường thích hợp cho khả năng ra rễ của chồi lan với số rễ trung bình/cây là 2,92 sau 6 tuần nuôi cấy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arditti and Ernst (1993). Micropropagation of orchid. New York. John Wiley & Sons, Inc.
- George, EF. and Sherrington, PD. (1984). Plant propagation by Tissue Culture. Eastern Press. England.
- Griesbach, R.J (2002). Development of *Phalaenopsis* Orchids for the Mass-Market. p. 458-465.
- Ichihashi and Hiraiwa (1996). Effects of solidifier, coconut water and carbohydrate source on growth of embryogenic callus in *Phalaenopsis* and allied general. J. Orchid Soc. India, 10: 81-88.
- Park et al., (2001). Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. Plant Cell, Tissue and organ Culture, 63: 67-72.
- Parisa Shekarriz, Mohsen Kafi, Shirin Dianati Deilamy, Masoud Mirmasoumi (2014). Coconut water and peptone improve seed germination and protocorm like. Agriculture Science Developments, 3(10): 317-322.
- Polonca KOŠIR (2004). Direct shoot regeneration from nodes of *Phalaenopsis* orchids. Acta agriculturae slovenica, 83 - 2, november 2004, p. 233 - 242
- Sagawa and Kunasaki (1982). Clonal propagation of orchids by tissue culture. In: Proc. 5th Cong. Plant Tissue and Cell Culture, p. 683-684.
- Tanaka et al., (1974). Studies on the clonal propagation of monopodial orchid by tissue culture. I. Formation of protocorm-like bodies from leaf tissue in *Phalaenopsis* and *Vanda* in vitro. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. (Cited in Tanaka et al., 1976).
- Tanaka (1990). Micropropagation of *Phalaenopsis* through leaf segment culture, In: Proceedings of NIOS 90. Nagoya, p.113-119.
- Zhang et al., (2004). Tissue culture and rapid micropropagation of *Phalaenopsis amabilis*. Journal of Plant Resources and Environment, 13: 38-40