

# PHÁT TRIỂN THỂ TIỀN CỬ TỪ MÔ LÁ NON TRONG VI NHÂN GIỐNG MỘT SỐ LAN HỒ ĐIỆP (*Phalaenopsis* sp.)

Nguyễn Thị Kim Huệ và Nguyễn Bảo Toàn<sup>1</sup>

## ABSTRACT

*Experiments were conducted to determine effects of plant growth regulators and positions on young leaf tissue arising protocorm like bodies. Results showed that surface sterilization obtained 78% of completely clean explants. Dormant buds of flower stalk were able to arise shoots in vitro in proportion of vegetative shoot 21,9% and reproductive shoot 46,9%. Pprotocorm- like bodies arose from pieces of young leaf tissue pieces of three Phalaenopsis cultivars KH, PRM and PWR on KHI medium supplemented different plant growth regulators. Two orchid cultivars PKH and PWR created proptocorm like bodies at medium added 2,4-D (0,25 mg/l) and NAA (0,25 mg/l) respectively. PRM cultivar was not arosen protocorm like body. Positions of leaf bottom gave rise the best protocorm like bodies. Medium (Lindemann, 1967) was supplemented BA 3,25 mg/l and NAA 0,2 mg/l to be very efficient on shoot propagation. Orchid plantlets were developped very good in medium KH3 supplemented 100 g of Xiem banana.*

**Keywords:** *Young leaf tissue; protocorm like bodies; Phalaenopsis*

**Title:** *Development of protocorm like bodies from young leaf tissue in micropropagation of orchid Phalaenopsis sp.*

## TÓM TẮT

*Thí nghiệm được thực hiện nhằm xác định hiệu quả chất điều hòa sinh trưởng và vị trí trên mô lá non phát sinh thể tiền củ (protocorm- like body). Kết quả thí nghiệm cho thấy rằng thao tác vô trùng mẫu cấy đạt 78% mẫu sạch. Mầm ngủ của phát hoa có thể phát sinh chồi trong ống nghiệm với tỉ lệ tạo chồi dinh dưỡng 21,9%, chồi sinh sản 46,9%. Sự tạo thể tiền củ từ mô lá non của ba giống lan Phalaenopsis PKH, PRM và PWR trên môi trường KHI có các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau. Hai giống PKH và PWR đều phát sinh thể tiền củ ở các môi trường có 2,4-D (0,25 mg/l) và NAA (0,25 mg/l) theo thứ tự. Giống PRM không phát sinh thể tiền củ. Vị trí gốc lá cho tỉ lệ tạo tiền củ cao nhất. Môi trường (Lindemann, 1967) có bổ sung BA 3,25 mg/l và NAA 0,2 mg/l có hiệu quả nhân chồi tốt nhất. Cây lan sinh trưởng tốt trong môi trường KH3 được bổ sung 100 g chuối Xiêm.*

**Từ khoá:** *Mô lá non; thể tiền củ, lan Hồ điệp*

## 1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan Hồ điệp là cây đơn thân, lá to, dày, mọc sát vào nhau, có nhiều hoa màu sắc đẹp và lâu tàn. Có nhiều phương pháp để nhân giống hoa này. Phương pháp truyền thống là cắt ngang chồi chính. Chồi chính khi bị cắt đi sẽ phát sinh chồi bên ở phần gốc. Khi các chồi này ra rễ có thể tách ra trồng. Phương pháp nhân giống vô tính theo kiểu truyền thống cho hệ số nhân thấp, vì cắt chồi chính thì mỗi cây mẹ chỉ có thể cho ra 2 hay 3 chồi mới thành cây con. Do đó, rất khó có thể hình thành một vườn ươm có số lượng lớn cây con cùng chủng loại. Để tăng hệ số nhân người ta

<sup>1</sup> Khoa Nông Nghiệp và Sinh Học Ứng Dụng Đại Học Cần Thơ

thường áp dụng phương pháp vi nhân giống trong ống nghiệm. Phương pháp này có thể sử dụng nhiều bộ phận trên cây lan Hồ điệp như mẫu cấy (explants) để nhân nhanh. Intuwong & sagawa (1974) đề nghị phương pháp cấy chồi (shoot tip culture). Ở phương pháp này các mẫu cấy được lấy từ các chồi sinh trưởng có 4-5 lá hoặc các chồi từ cây con phát sinh có thể từ mầm ngủ của phát hoa. Phương pháp này chủ yếu là kích thích mầm ngủ trên thân chính. Tanaka và Hasegawa (1975) và Tanaka & Sakanishi (1977,1978) đã đề nghị một cách nhân khác là kích thích mầm ngủ của phát. Khi kích thích mầm ngủ phát hoa các vị trí mầm ngủ có thể phát sinh thành nhiều loại chồi như chồi dinh dưỡng, chồi sinh dục hoặc chồi không phát triển. Các chồi này cũng được sử dụng như là mẫu cấy trong vi nhân giống. Với phương pháp này họ cũng đã nuôi cấy thành công giống lan Hồ điệp *Phalaenopsis amabilis* từ mô lá non của chồi sinh dưỡng và tạo ra các thể tiền củ (protocorm-like body). Sự hình thành thể tiền củ có thể là phương pháp nhân rất nhanh giống lan này. Sự thành công của phương pháp đã mở ra triển vọng nhân nhanh giống lan Hồ điệp. Lin (1987) nghiên cứu quá trình hình thành thể tiền củ từ thân phát hoa non và ông ta đã thành công trong vi nhân giống lan Hồ điệp từ các lát cắt trên trục phát hoa non. Các phương pháp vi nhân giống trên đã mang lại nhiều lợi ích bởi vì ta có thể sử dụng phát hoa non như là mẫu cấy mà không làm hại đến sự sinh trưởng của cây mẹ. Hiện nay nhiều giống lan Hồ điệp lai có hoa rất đẹp. Không thể dùng phương pháp gieo hạt để tạo số lượng lớn cây con vì khó kiểm soát được tính đồng nhất. Để tạo ra một số lượng lớn các giống lan lai này, thí nghiệm nhằm mục đích xác định hiệu quả chất điều hòa sinh trưởng và vị trí phát sinh thể tiền củ từ mô lá non.

## 2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

### 2.1 Nguồn vật liệu thí nghiệm

Các giống lan lai nhập nội được sử dụng cho các thí nghiệm là:

- PWR. Hoa có màu tím chấm
- PKH. Hoa có màu trắng chấm
- PM. Hoa có màu trắng lưỡi tím

### 2.2 Môi trường nuôi cấy

- **Môi trường cơ bản MS** (Murashige và Skoog, 1962) bao gồm các thành phần sau đa lượng và vi lượng sau :

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1650 mg/l; KNO<sub>3</sub> 1900 mg/l; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 440 mg/l ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 170 mg/l ; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 370 mg/l ; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 27,8 mg/l ; Na<sub>2</sub>EDTA 33,6 mg/l ; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 6,2 mg/l ; MnSO<sub>4</sub> 4H<sub>2</sub>O 22,3 mg/l ; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 8,6 mg/l ; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,25 mg/l ; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,025 mg/l; KI 0,83 mg/l ; CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 0,025 mg/l

- **Môi Trường Lindemann (1967)** có các thành phần đa lượng như sau :

Khoáng đa lượng bao gồm các thành phần sau Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 347 mg/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 135 mg/l ; KCl 1050 mg/l ; MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O 59 mg/l ; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1000 mg/l ; Khoáng vi lượng theo vi lượng MS bao gồm FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 27,8 mg/l ; Na<sub>2</sub>EDTA 33,6 mg/l ; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 6,2 mg/l ; MnSO<sub>4</sub> 4H<sub>2</sub>O 22,3 mg/l ; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 8,6 mg/l ; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,25 mg/l ; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,025 mg/l ; KI 0,83 mg/l ; CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 0,025 mg/l.

## 2.3 Chuẩn bị thí nghiệm

### 2.3.1 Pha chế môi trường

Các khoáng đa lượng và vi lượng của môi trường nuôi cấy cho vào một dụng cụ chứa, sau đó thêm vào các thành phần bổ sung như vitamin, chất điều hòa sinh trưởng, đường, agar, than hoạt tính, nước dừa tùy theo từng thí nghiệm. Khuấy đều, sau đó đem nấu tan agar. Hiệu chỉnh pH ở 5,7. Rót môi trường vào các keo có kích thước cao 12 cm, đường kính 8 cm. Tất cả keo được khử trùng trong nồi hấp khử trùng (autoclave) ở 112°C trong 30 phút, áp suất 50 kPa.

### 2.3.2 Điều kiện thí nghiệm

Điều kiện phòng nuôi cấy mô: Nhiệt độ  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , cường độ ánh sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày.

## 2.4 Phương pháp nghiên cứu

### 2.4.1 Kích thích mầm ngủ phát hoa phát triển thành chồi

- Vật liệu dùng làm thí nghiệm là các phát hoa của các giống đã được liệt kê bên trên. Các phát hoa sử dụng cho thí nghiệm còn chứa các mầm ngủ. Phát hoa được cắt rời khỏi cây mẹ, sau đó được rửa dưới nước máy đang chảy khoảng 5 phút để loại bỏ đi các phần bám bên ngoài. Kế đến dùng vải mềm chà rửa phát hoa với bột giặt trong 20 phút và rửa lại với nước máy đang chảy trong 3-4 phút.
- Các bước kế tiếp được thực hiện trong tủ cấy vô trùng. Lau trực phát hoa bằng cồn 70° trong 1 phút. Cắt từng đoạn mang nhiều lông cho vào keo và ngâm với dung dịch tẩy trùng Clorox đậm đặc (chất tẩy thương mại) trong 10 phút. Rửa lại với nước cất vô trùng 3 lần. Tiếp tục ngâm trong  $\text{HgCl}_2$  (2%o) khoảng 7 phút, vớt từng đoạn ra keo sạch và rửa lại nước cất vô trùng 3 lần. Mẫu đã được khử trùng xong, mỗi mắt phát hoa có mang mầm ngủ được cắt ngang thành các đoạn 2-4 cm. Sau đó cấy các đoạn vào môi trường nuôi cấy. Môi trường kích thích mầm ngủ phát hoa phát triển thành chồi là môi trường cơ bản MS có bổ sung thêm Naphthalene acetic acid (NAA) 4 mg/l; Benzyl adenine (BA) 15 mg/l; thiamine 1 mg/l, pyridoxine 1 mg/l, nicotinic acid 5 mg/l; riboflavin 1 mg/l, inositol 100 mg/l, citric acid 20 mg/l; malic acid 20 mg/l; đường 20 g/l; agar 8 g/l cho đến khi các mầm ngủ phát triển thành chồi sinh dưỡng.

### 2.4.2 Phát triển chồi sinh dưỡng thành cây con

Các chồi sinh dưỡng được tách ra và cấy vào môi trường cơ bản MS có bổ sung các thành phần đường 30 g/l; agar 8 g/l để phát triển thành cây con. Khi cây con đạt kích thước lá 3-4 cm, lá của các cây con này được sử dụng như là nguồn cung cấp mẫu cấy (explants) cho các thí nghiệm tạo thể tiền củ (protocorm-like bodies).

### 2.4.3 Xác định hiệu quả của auxin khác nhau lên sự tạo thể tiền củ từ mô lá non

- *Vật liệu:* Mẫu phiến lá non được cắt thành các ô vuông có kích thước  $3 \times 3 \text{ mm}^2$
- Môi trường thí nghiệm được ký hiệu là KH1 là môi trường cơ bản MS (Murashige và Skoog, 1962) có nồng độ khoáng giảm một nửa và các hóa chất khác được thêm vào môi trường là thiamine 0,5 mg/l; pyridoxine 0,5 mg/l; nicotinic acid 2mg/l; riboflavin 0,5 mg/l; BA 7,5 mg/l; Inositol 50 mg/l; đường 20 g/l; nước dừa 100 ml; Agar 8 g/l.

- Thí nghiệm được bố trí theo thể thức thừa số 2 nhân tố. Nhân tố 1 là môi trường bao gồm bốn môi trường: KH1 + IAA 0,25 mg/l; KH1 + NAA 0,25 mg/l, KH1 + IBA 0,25 mg/l; KH1 + 2,4-D 0,25 mg/l. Nhân tố 2 là giống bao gồm ba giống lan Hồ điệp PKH, PRM và PM. Thí nghiệm có 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 1 keo, mỗi keo có 9 lát cắt. Các mẫu cây được đặt trong tối 2 tuần, sau đó chuyển ra ngoài sáng.

#### 2.4.4 Xác định vị trí phát sinh thể tiền củ trên mô lá non

- *Vật liệu*: Mẫu lá non từ các chồi đã được chuẩn bị ở giai đoạn kích thích hình thành chồi. Mẫu phiến lá non được chia thành ba phần chóp lá, giữa lá và gốc lá. Các lá non được cắt thành các mảnh nhỏ có kích thước ngang 2 mm và dài 3 mm.
- Môi trường thí nghiệm tương tự thí nghiệm trên (KH1) là môi trường cơ bản MS (Murashige & Skoog, 1962) có nồng độ khoáng giảm một nửa và các hóa chất khác được thêm vào môi trường là NAA 0,25 mg/l, thiamine 0,5 mg/l; pyridoxine 0,5 mg/l; nicotinic acid 2 mg/l; riboflavin 0,5 mg/l; BA 7,5 mg/l; inositol 50 mg/l ; đường 20 g/l; nước dừa 100 ml; agar 8 g/l.
- Thí nghiệm được bố trí theo thể thức thừa số 2 nhân tố. Nhân tố 1 là giống bao gồm ba giống lan Hồ điệp PKH, PRM và PM. Nhân tố 2 là vị trí phiến lá. Thí nghiệm có 4 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 1 keo. Mỗi keo bao gồm ba vị trí chóp lá, giữa lá và gốc lá.

#### 2.4.5 Xác định hiệu quả của tổ hợp BA và các loại auxin lên sự tạo chồi

- *Vật liệu*: Cụm thể tiền củ 3 tháng tuổi của giống PWR được tạo từ lát mô lá non của thí nghiệm trên được sử dụng cho thí nghiệm này.
- Môi trường thí nghiệm là môi trường cơ bản KH2 có khoáng đa lượng theo Lindemann (1967) được bổ sung thêm vi lượng theo MS (1962) và các thành phần khác gồm các vitamin: thiamine 1 mg/l; pyridoxine 1 mg/l; nicotinic acid 1 mg/l; riboflavin 1 mg/l; BA 7,5 mg/l than hoạt tính 3 g/l; inositol 100 mg/l; nước dừa 100 ml/l, đường 30 g/l; agar 8 g/l. Các auxin được sử dụng cho thí nghiệm bao gồm Indol acetic acid (IAA) 0,5 mg/l; Indol butyric acid (IBA) 0,5 mg/l; Naphthalene acetic acid (NAA) 0,5 mg/l và NAA 0,2 mg/l. Bố trí thí nghiệm theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên có 4 nghiệm thức với 5 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là một keo, mỗi keo có 1 cụm tiền chồi.

#### 2.4.6 Đánh giá hiệu quả của các thành phần hữu cơ không xác định lên sự sinh trưởng của lan con

- *Vật liệu*: Chọn những cây lan con xanh tốt, chiều cao trung bình từ 1cm đến 2 cm của giống PWR.
- *Môi trường nền (KH3)*: Môi trường khoáng đa lượng theo Lindemann (1967) có bổ sung vi lượng theo MS, agar 8 g/l, than 3 g/l, đường 30 g/l.
- *Bố trí thí nghiệm* theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 4 nghiệm thức: KH3 + Peptone 1000 mg/l, KH3 + Chuối 100 g/l, KH3 + Cà chua 100 g/l, KH3 + Malt extract 1000 mg/l với 6 lần lặp lại, mỗi lần là một keo, mỗi keo gồm 1 cây con.

### 2.5 Chỉ tiêu theo dõi

- Thời gian xuất hiện thể tiền củ (protocorm like body): được tính từ khi cấy mẫu cho đến khi tiền củ được hình thành.

- Số chồi trên một cụm.
- Chiều cao cây: đo từ gốc đến chóp lá cao nhất
- Số lá: đếm các lá nhú ra thấy được.
- Số rễ: đếm các rễ nhú ra thấy được.
- Phần trăm vị trí lá có sự xuất hiện tiền chồi.

### 2.6 Phân tích số liệu

Các số liệu được phân tích và thử bằng phép thử F và LSD 5% bằng phần mềm MSTATC. Các số liệu có giá trị phần trăm trong khoảng 0-100% thì đổi sang Arcsin $\sqrt{x}$  theo công thức tính trong bảng Excel là:  $\arcsin(\sqrt{x}/10) \cdot 180/3,1416$ . (với x là giá trị phần trăm cần đổi). Trong đó: 0% được thay bằng (1/4n)%, 100% được thay bằng (100-1/4n)% (n là số mẫu cây trong một keo) (Gomez & Gomez, 1984).

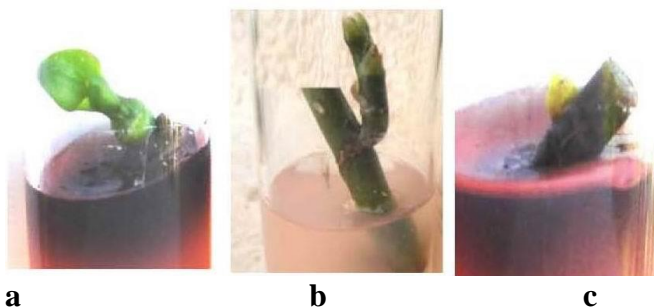
## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Kích thích mầm ngủ phát hoa phát triển thành chồi

**Bảng 1: Sự phát triển của mẫu cây ở thời điểm 35 ngày sau khi cấy**

Mẫu cây	Số mẫu cây	Số mẫu tạo chồi		Số mẫu không phát triển	Số mẫu nhiễm
		Chồi sinh sản	Chồi sinh dưỡng		
Phát hoa	100%	46,9%	21,9%	9,4%	21,8%

Kết quả thí nghiệm cho thấy rằng vào 7 ngày sau khi cấy (NSKC), các mầm ngủ ở vị trí gần hoa nở đầu tiên mầm chồi ngủ bắt đầu nhú chồi màu xanh. Tuy nhiên, ở đáy đoạn phát hoa mang mầm ngủ có sự tiết phenol làm cho môi trường ở vùng đoạn phát hoa có màu nâu. Những mẫu cây ở gần gốc phát hoa, mầm ngủ không phát triển và trở nên nâu dần. Ở 21 ngày sau khi cấy (NSKC), các mầm ngủ nhú ra (khoảng 0,5 cm) và có màu xanh. Điều này cho thấy rằng, mẫu cây thích nghi tốt với môi trường nuôi cấy. Ở 35 NSKC, chồi sinh dưỡng xuất hiện một lá (Hình 1a), chồi sinh sản xuất hiện 2-3 mắt có lá bắc (Hình 1b).



**Hình 1: Các dạng chồi được hình thành từ mầm ngủ trực phát hoa.**  
a/ chồi sinh dưỡng; b/ chồi sinh sản ; c/ chồi không phát triển

Chồi sinh dưỡng là chồi có thể sử dụng để tạo cây con. Trong khi đó, chồi sinh sản là chồi phát triển tiếp để phát triển thành hoa. Sự phát triển của mẫu cây phụ thuộc nhiều vào kỹ thuật lấy mẫu và vị trí của mầm ngủ. Tanaka & Sakanishi (1978) cho rằng ở vị trí càng gần gốc của phát hoa thì tỉ lệ nhiễm càng cao và thường không phát triển do ảnh hưởng ức chế của acid abscisic (ABA) và các hợp chất phenol. Bảng 1 cho thấy tỉ lệ chồi sinh sản cao hơn chồi sinh dưỡng, kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Tanaka

và Sakanishi (1977): nhiệt độ 25°C thuận lợi để chồi sinh sản phát triển, ngoại trừ những mầm ở vị trí thấp hơn sẽ phát triển thành chồi sinh dưỡng.

### 3.2 Phát triển thành cây con

Các chồi sinh dưỡng đã hình thành lá thật được tách ra và cấy vào môi trường cơ bản MS sau 4 tháng hình thành cây con đạt kích thước 3-4 cm (Hình 2).



Hình 2: Sự hình thành cây con từ chồi sinh dưỡng sau 4 tháng nuôi cấy

### 3.3 Hiệu quả của các auxin khác nhau lên sự tạo thể tiền củ từ mô lá non

Kết quả Bảng 2 cho thấy ở 8 tuần sau khi cấy (TSKC) tỉ lệ lá chết trung bình giữa các nghiệm thức môi trường có auxin không khác biệt, nhưng có sự khác biệt giữa ba giống. Cả 3 giống đều có hiện tượng tiết phenol ảnh hưởng đến sự sống của các mảnh lá non. Giống PRM có tỉ lệ mảnh lá chết cao nhất (58,8 %), giống PWR có tỉ lệ lá chết thấp hơn (34,4 %) và thấp nhất ở giống PKH (19,6%). Kết quả này cho thấy có sự khác biệt giữa các giống lan khi bị ảnh hưởng của phenol tiết ra từ mảnh lá bị tổn thương. Các sản phẩm oxy hóa của hợp chất này khuếch tán vào môi trường nuôi cấy làm mẫu cấy chuyển sang màu nâu hoặc đen và sau cùng mẫu chết (Morel, 1974).

Bảng 2: Tỉ lệ phần trăm mảnh lá chết của 3 giống lan *Phalaenopsis sp.* ở 8 tuần sau khi cấy (TSKC)

Môi trường	Giống			
	PKH	PRM	PWR	Trung bình
KH1+ IAA 0,25 mg/l	11,12 (16,18)	96,27 (82,87)	59,27 (47,34)	(48,8)
KH1+ NAA 0,25 mg/l	7,41 (13,29)	55,55 (48,24)	29,63 (32,69)	(31,4)
KH1+ IBA 0,25 mg/l	14,82 (18,56)	77,78 (62,38)	33,33 (34,11)	(38,3)
KH1+ 2,4-D 0,25 mg/l	33,34 (30,31)	44,44 (41,75)	22,23 (23,63)	(31,9)
Trung bình	(19,6) b	(58,8) a	(34,4) b	
Giống (G)		**		
Môi trường (M)		ns		
G x M		ns		

Trên cùng một hàng các số trung bình theo sau cùng một chữ thì không khác biệt có ý nghĩa. \*\*: khác biệt có ý nghĩa mức 1%; ns: khác biệt không ý nghĩa ở mức 5%. Các số trong ngoặc là giá trị phần trăm đã đổi sang arcsin $\sqrt{x}$ .

Kết quả Bảng 3 cho thấy tỉ lệ lá xuất hiện thể tiền củ khác nhau giữa các giống lan và các môi trường có dạng auxin khác nhau ở mức độ ý nghĩa 1%. Hai giống PKH và PWR cho tỉ lệ tạo tiền củ tương đối cao, trong đó giống PKH đạt tới 62,82% ở nghiệm thức có NAA 0,25 mg/l và 45,24% ở giống PWR (Hình 3). Trong khi giống PRM không thấy xuất hiện tiền củ. Vì vậy, sự xuất hiện các dạng tiền củ tùy thuộc nhiều vào đặc tính giống. Sự xuất hiện các thể tiền củ liên quan đến sự chết phiến lá (Bảng 2). Giống PRM có tỉ lệ chết của phiến lá cao. Sự chết phiến lá chủ yếu do sự tiết phenol trong lá khi bị tổn thương. Trong 4 loại auxin được cho vào môi trường cơ bản KH1 ở cùng nồng độ thì IBA kích thích sự tạo tiền củ thấp nhất ở hai giống PKH và PWR.



**Hình 3: Sự phát sinh tiền củ từ mô lá non giống PWR trên môi trường KH1 có bổ sung 2,4-D 0,25 ppm ở 8 TSKC**

**Bảng 3: Hiệu quả của các auxin khác nhau trên phần trăm tạo thể tiền củ từ mô lá non ở các giống lan Hồ điệp ở 8 tuần sau khi cấy**

Môi trường	Giống			Trung bình
	PKH	PRM	PWR	
KH1 + IAA 0,25 mg/l	77,78 (67,51)	0 (1,65)	29,63 (28,39)	32,52 ab
KH1 + NAA 0,25 mg/l	85,19 (74,98)	0 (1,65)	59,26 (55,12)	43,92 a
KH1 + IBA 0,25 mg/l	66,67 (59,45)	0 (1,65)	29,63 (26,82)	29,30 b
KH1 + 2,4-D 0,25 mg/l	74,07 (65, 35)	0 (1,65)	77,77 (70,65)	45,88 a
Trung bình	(62,82) a	(1,65) c	(45,24)b	
Giống (G)		**		
Môi trường (M)		*		
G x M		**		

Trên cùng một cột hoặc một hàng các số trung bình theo sau cùng một chữ thì không khác biệt có ý nghĩa. \*: khác biệt có ý nghĩa ở mức 5%; \*\*: khác biệt có nghĩa 1%; ns: khác biệt không ý nghĩa. Các số trong ngoặc là giá trị phần trăm đã đổi sang arcsin√x.

### 3.4 Vị trí phát sinh thể tiền củ trên mô lá non

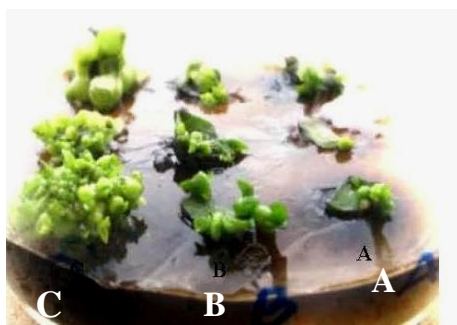
**Bảng 4: Hiệu quả của các vị trí lá khác nhau trên phần trăm tạo tiền chồi ở các giống lan Hồ điệp theo thời gian (tuần)**

Giống	Vị trí trên phiến lá	Tuần sau khi cấy		
		4	6	8
PKH	Chóp lá	2,78 (4,41)	44,44 (40,58) ab	55,56 (56,65) bc
	Giữa lá	13,89 (13,29)	61,11 (53,85) ab	66,67 (65,5) ab
	Gốc lá	13,89 (13,29)	66,67 (58,27) a	83,33 (78,33) a
PRM	Chóp lá	0 (1,65)	0 (1,65) d	0 (1,65) d
	Giữa lá	0 (1,65)	0 (1,65) d	0 (1,65) d
	Gốc lá	0 (1,65)	0 (1,65) d	0 (1,65) d
PWR	Chóp lá	0 (1,65)	13,89 (14,48) cd	19,43 (20,08) d
	Giữa lá	0 (1,65)	36,11 (33,35) bc	44,43 (41,75) c
	Gốc lá	8,3 (8, 86)	55,56 (49,42) ab	83,33 (73,89) ab
Giống (G)		**	**	**
Vị trí (V)		ns	*	**
G x V		ns	ns	**
CV (%)		220,66	98,92	65,07

Trên cùng một cột (hàng) các số trung bình theo sau cùng một chữ thì không khác biệt có ý nghĩa. \*: khác biệt có ý nghĩa ở mức 5%; \*\*: khác biệt có ý nghĩa 1%; ns: khác biệt không ý nghĩa. Các số trong ngoặc là giá trị phần trăm đã đổi sang arcsin√x.

Kết quả Bảng 4 cho thấy, ở các vị trí khác nhau trên phiến lá đều tạo tiền củ và tỉ lệ tăng dần theo thời gian. Hai giống có tỉ lệ tạo tiền củ cao là PKH và PWR. Tốc độ tạo thể tiền củ tăng nhanh ở tuần thứ 6 nhưng sau tuần thứ 8 bắt đầu chậm lại. Tại vị trí gốc lá cho tỉ lệ tạo tiền củ cao nhất ở cả hai giống PKH và PWR (Hình 4). Phân tích thống kê cũng cho thấy có sự tương tác giữa giống và vị trí trên phiến lá ở tuần thứ 8.





**Hình 4:** Vị trí trên lá phát sinh tiền củ từ mô lá non giống lan Hồ điệp PKH trên môi trường KH1 có bổ sung NAA 0,25 ppm ở 8 TSKC. A: Chóp lá; B: Giữa lá; C: Góc lá

Vị trí trên phiến lá có ảnh hưởng nhiều đến sự tạo thể tiền củ. Ở vị trí góc lá sự phát sinh thể tiền củ cao hơn các vị trí giữa lá và chóp lá. Theo sự phát sinh tuổi tế bào trên phiến lá thì vị trí góc lá có tuổi tế bào non hơn các vị trí phía ngoài. Tanaka và Hasegawa (1975) báo cáo các mảnh lá mô non từ cây con tương đối dễ hình thành thể tiền củ và họ không thành công cấy mô lá non trên cây trưởng thành.

### 3.5 Hiệu quả của tổ hợp BA và các loại auxin lên sự tạo chồi

Kết quả phân tích trình bày ở Bảng 5 cho thấy hiệu quả của tổ hợp BA và auxin lên khả năng biến đổi thành chồi ở giống PWR có khác biệt có ý nghĩa 1% ở 40 ngày sau khi cấy. Trên môi trường cơ bản KH2 có bổ sung NAA 0,2 mg/l cho số chồi nhiều nhất, kích thước cụm chồi cũng tăng mạnh và có sự tạo rễ (Hình 5). So với các môi trường còn lại số chồi cũng tăng nhưng không nhiều, kích thước cụm không tăng hoặc tăng rất ít. Do không thể lấy mẫu ra bên ngoài để đo kích thước chính xác. Sự tạo rễ và sự tăng kích thước cụm chồi được đánh giá bằng cách đo gián tiếp bên ngoài keo nuôi cấy. Vì vậy, các giá trị được tính như (+) có sự hiện diện hoặc gia tăng.

**Bảng 5:** Hiệu quả của tổ hợp BA và các auxin lên sự tạo chồi mới từ cụm tiền chồi của giống PWR ở 40 ngày sau khi cấy

Nghiệm thức	Số chồi	Tạo rễ+/-	Sự tăng kích thước của cụm chồi
KH2+BA 7,5 mg/l + IAA 0,5 mg/l	0,8 b	+	-
KH2+BA 7,5 mg/l + IBA 0,5 mg/l	1,6 b	++	+
KH2+BA 7,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l	1,6 b	+	++
KH2+BA 7,5 mg/l + NAA 0,2 mg/l	3,0 a	+	++
F	**		

+ -: có tạo rễ, kích thước cụm không tăng; ++: có tạo rễ, kích thước cụm tăng.



**Hình 5:** Cụm tiền củ phát sinh chồi trên môi trường KH2 có bổ sung NAA 0,25 mg/l giống PWR ở 30 NSKC.



### 3.6 Hiệu quả của các thành phần hữu cơ không xác định lên sự sinh trưởng của lan con

Từ kết quả Bảng 6 cho thấy ở 3 tháng sau khi cấy các môi trường khác nhau không có sự khác biệt giữa số lá, số rễ. Tuy nhiên, có sự khác biệt về chiều cao gia tăng. Môi trường đối chứng có chiều cao gia tăng thấp nhất và khác biệt có ý nghĩa với các môi trường có bổ sung cà chua, chuối và pepton, nhưng không khác biệt với môi trường có Malt extract. Các thành phần hữu cơ không xác định thường được cho vào môi trường nuôi cấy ở giai đoạn cuối.

**Bảng 6: Hiệu quả của các thành phần hữu cơ không xác định lên sự gia tăng số lá, số rễ, chiều cao trung bình của lan con ở 3 tháng sau khi cấy**

Nghiệm thức	Số lá	Số rễ	Chiều cao gia tăng (cm)
KH3 (Đối chứng)	2,3	3,8	0,6 b
KH3 + peptone 1000 mg/l	2,3	3,8	1,3 a
KH3 + chuối 100 g/l	2,8	5,0	1,5 a
KH3 + cà chua 100 g/l	2,3	4,0	1,4 a
KH3 + malt extract 1000 mg/l	2,6	3,3	0,7 b
F	ns	ns	*

Trên cùng một cột các số trung bình theo sau cùng một chữ thì không khác biệt có ý nghĩa.

\*: khác biệt có ý nghĩa 5%; ns: khác biệt không ý nghĩa



**Hình 6: Sự sinh trưởng và phát triển của lan con trên môi trường KH3 có bổ sung dịch trích chuối theo thời gian**

Đối với sự gia tăng chiều dài rễ, kết quả Bảng 7 cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa về sự gia tăng số rễ ở 3 tháng sau khi cấy. Tuy nhiên, môi trường chuối có sự gia tăng về số chồi mới và có sự khác biệt ý nghĩa thống kê. Bảng 7: Chiều dài rễ, số chồi mới trung bình 3 tháng sau khi cấy

Nghiệm thức	Chiều dài rễ (cm)	Số chồi mới
KH3 (Đối chứng)	2,80	0,16 b
KH3 + peptone 1000 mg/l	2,85	0,17 b
KH3 + chuối 100 g/l	4,52	2,0 a
KH3 + cà chua 100 g/l	4,23	1,17 ab
KH3+malt extract 1000 mg/l	4,47	1,17 ab
F	ns	*

Trên cùng một cột số trung bình theo sau bởi cùng một chữ thì không khác biệt có ý nghĩa.

\*: khác biệt có ý nghĩa ở mức 5%; ns: khác biệt không ý nghĩa ở mức 5%.

George (1993) cho rằng dịch trích chuối thường được sử dụng để kích thích sự sinh trưởng lan trong môi trường nuôi cấy, do nó giúp ổn định pH trong môi trường nuôi cấy. pH quyết định sự hòa tan của khoáng, ảnh hưởng lên sự hấp thu khoáng trong môi trường, do đó mà sự vận chuyển các chất từ môi trường để nuôi sống cây được thuận lợi. Bên trong chuối còn chứa hàm lượng kali tương đối cao, là thành phần xúc tác của nhiều enzyme và vai trò của nó có liên quan nhiều đến sự tổng hợp carbohydrat giúp cây sinh trưởng tốt hơn. Bên cạnh đó, chuối là nguồn vật liệu dễ tìm, giá thành thấp hơn

peptone và malt extract; vì vậy, có thể hạ thấp chi phí sản xuất nhiều hơn. Việc lựa chọn môi trường có dịch trích chuối sẽ cho hiệu quả tốt nhất lên sự sinh trưởng và phát triển của lan con. Theo Perez (1994) để cây sinh trưởng mạnh thường các thành phần hữu cơ được cho vào trong môi trường như chuối, cà chua mặc dù thành phần nào trong các thành phần này ảnh hưởng trên sự sinh trưởng của cây con thì đến nay chưa được biết rõ. Rahman *et al.* (2004) cho rằng thêm các thành phần hữu cơ không xác định như dịch trích khoai tây, dịch trích bắp và dịch trích trái đu đủ làm gia tăng sự sinh trưởng của lan con *Doritaenopsis*.

#### 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Thí nghiệm nhân giống lan Hồ điệp (*Phalaenopsis* sp.) từ mầm ngủ phát hoa đạt được các kết quả sau: thao tác vô trùng mẫu cấy: Tỷ lệ mẫu vô trùng đạt 78%. Mầm ngủ phát hoa có thể tạo chồi trong ống nghiệm với tỷ lệ tạo chồi sinh dưỡng 21,9%, chồi sinh sản 46,9%. Sự tạo tiền củ từ mô lá non cắt rời của mầm ngủ đều tạo ra tiền chồi trên môi trường ½ MS. Giống PWR cho tỷ lệ tạo tiền củ cao nhất ở môi trường có kích thích tố NAA (0,25 mg/l). Giống PKH cho tỷ lệ tạo tiền chồi cao nhất ở môi trường có kích thích tố NAA (0,25 mg/l). Tại vị trí gốc lá cho tỷ lệ tạo tiền củ cao nhất. Nhân chồi: Sử dụng môi trường Lindemann (1967) có bổ sung tổ hợp BA 3,25 mg/l + NAA 0,2 mg/l cho hiệu quả nhân chồi tốt nhất. Cây lan sinh trưởng tốt trong môi trường KH3 được bổ sung 100 g chuối xiêm.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- George, E.F. (1993). Plant propagation by tissue culture. Part 1,2. Second Edition. Exergetics Limited.
- Gomez, K.A. and A.A.Gomez, (1984). Statistical Procedures for Agricultural Research. Second Edition. p: 306-308.
- Intuwong, O and Y. Sagawa, (1974). Clonal propagation of *Phalaenopsis* by shoot tip culture. Am. Orchid Soc. Bull.43: 893-895
- Lindemann, E. G. P. (1967). Growth requirements for meristem culture of *Cattleya*. Diss. Abstr. Sect B28: 2284-2285.
- Lin, C.C (1987) Histological observation on in vitro formation of protocorm like bodies flower stalk internodes of *Phalaenopsis*. Lindyelana 2: 58-65.
- Morel, G. M. (1974). Clonal multiplication of orchids. In: Withner CL (Ed.). The Orchids-Scientific studies, p: 169-222, Wiley-Interscience, New York
- Murashige T and F Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Perez, C. B. (1994). The Philippines Recommends for Orchids. Philippine council for agriculture, forestry and natural resources research and development. 1-2, 57-58.
- Rahman, A.R.M, M.O, Islam, A. K. M. Azad-ud-doula Prodhani and S. Ichihashi (2004). Effects of Complex Organic Extracts on Plantlet Regeneration from PLBs and Plantlet Growth in the *Doritaenopsis* Orchid. *JARQ* 38 (1), 55 – 59. <http://www.jircas.affrc.go.jp>
- Tanaka, M. and A. Hasegawa, (1975). Studies on the clonal propagation of monopodial orchids by tissue culture. I: Formation of protocorm-like bodies from leaf tissue in *Phalaenopsis* and *Vanda*. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 44: 47-58
- Tanaka, M. and Y. Sakanishi, (1977). Clonal propagation of *Phalaenopsis* by leaf tissue culture. *Am. Orchid Soc. Bull.* 46:733-737.
- Tanaka M. and Y Sakanishi. (1978). Factors affecting the growth of in vitro cultured lateral buds from *Phalaenopsis* flower stalks. *Scientia Horticulturae.* 8: 169-178.