Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Tập 33, Số 1 (2017) 48-57

Nhân giống lan Đai châu đỏ (*Rhynchostylisgigantea* L.) bằng công nghệ nuôi cấy *in vitro*

Phan Thị Thu Hiền*, Nguyễn Văn Đính

Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2, Xuân Hòa, Phúc Yên, Vĩnh Phúc

Nhận ngày 28 tháng 11 năm 2016

Chỉnh sửa ngày 12 tháng 12 năm 2016; Chấp nhận đăng ngày 23 tháng 03 năm 2017

Tóm tắt: Đai châu đỏ (*Rhynchostylisgigantea* L.) là loài lan quý, có nguy cơ bị tuyệt chủng do bị mất môi trường sống thích hợp và sự khai thác quá mức của con người. Việc nhân giống *in vitro* là phương pháp hữu hiệu để tăng cường số lượng, giúp bảo tồn nguồn gen. Hạt lan 09 tháng tuổi là mẫu cấy tối ưu được sử dụng là vật liệu khởi đầu cho nuôi cấy *in vitro.* Hạt nảy mầm trên môi trường MS cho tỷ lệ nảy mầm tạo protocorm đạt 84,62%. SM5 (MS bổ sung 2.0 mg l/1 BAP và 1.0 mgl IBA) tăng tỷ lệ tạo phôi soma và số lượng phôi soma/cụm protocorm. Chồi được phát triển sau 08 tuần trên môi trường MS có bổ sung 0.5 mg/l BAP và 0,5 mg/l Kinetin**.** Môi trường này khi bổ sung thêm nước dừa 20%, tỷ lệ tái sinh đạt 41,41%, chiều dài chồi đạt 4,33 cm sau 08 tuần nuôi cấy. Chồi đạt chiều dài khoảng 4 cm được chuyển sang môi trường ra rễ MS có bổ sung 1,5 mg/L NAA, cho tỷ lệ ra rễ đạt 50,67%. Cây có bộ rễ hoàn chỉnh được chuyển sang bầu với giá thể nuôi là dớn và xơ dừa tỷ lệ 1:1 trong điều kiện nhà lưới nhiệt độ 25 ± 2^{o}C, tỷ lệ cây con sống sót là 98,41%. Quy trình này hiệu quả với việc nhân nhanh một lượng cây con lớn nhằm bảo tồn nguồn giống *in vitro* và ex vitro ở giống lan đai châu đỏ (*Rhynchostylisgigantea* L.).

Từ khóa: *Rhynchostylisgigantea* L., nhân nhanh, *in vitro, phôi soma, protocorm, giá thể.*

1. Đặt vấn đề

Phong Lan (Orchidaceae) được coi là họ lớn nhất trong giới thực vật có hoa bao gồm 880 chi và hơn 25.000 loài [1]. Một trong những phương thức chủ yếu của công nghệ sinh học để bảo tồn sự đa dạng và có được nguồn giống dồi dào các giống hoa lan quý là nhân nhanh *in vitro.* Hạt giống hoa lan được nảy mầm nhờ nấm cộng sinh đặc hiệu, giúp tăng cường khả năng nảy mầm. Nghiên cứu của Moore (1849), Bernard (1899) [2, 3], Knudson (1922) đã phát triển các cây con từ hạt trên môi trường dinh dưỡng *in vitro* [4]. Sau đó, Rotor (1949) và Morel (1960) đi tiên phong trong nuôi cấy *in vitro* từ phát sinh cơ quan [5, 6]. Từ đó, việc phát triển số lượng lớn cây giống dựa vào nuôi cấy *in vitro* bắt đầu phát triển và được thương mại hóa ở nhiều nước [7]. Bên cạnh việc sử dụng hạt làm nguyên liệu *in vitro,* các chồi đỉnh, chồi nách, đoạn thân, protocorm, protoplast…đều có thể tái sinh, phát triển thành cây hoàn chỉnh và nhân nhanh [8-11]. Những công trình này đã cung cấp cho thị trường một số lượng lớn cây giống và góp phần bảo tồn các cây phong lan nhiệt đới quý hiếm. Tuy vậy, một nhược điểm dễ thấy khi nuôi cấy *in vitro* là xuất hiện các biến dị soma trong quá trình nuôi cấy nguyên liệu thực vật qua nhiều thế hệ [12,

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-914838607.
Email: hienphandt87@gmail.com

13]. Nhiều môi trường được sử dụng: MS có bổ sung chất kích thích sinh trưởng khác nhau như BA, thidiazuron (TDZ), BAP, NAA, 3-indoleacetic acid (IAA) and gibberellic acid (GA3) [14-16]. Vật liệu ban đầu để tạo protocorm có thể là hạt, hoặc lát cắt lớp mỏng tế bào sinh dưỡng [17-18]. Hiện nay, có rất nhiều công trình nghiên cứu *in vitro* thành công ở cây phong lan với nhiều loài, vật liệu và môi trường nuôi cấy, có hiệu quả khác nhau [19-23]. Ở Việt Nam, có rất nhiều công trình đã nghiên cứu nhân giống *in vitro* các giống như lan hồ điệp hoa trắng nhị vàng *Phalaenopsis* Sogo Yukidian [24], *Dendrobium, Catleya và Phalaenopsis* [25]. Lan Đai Châu *(Rhynchostylis gigantea)* thuộc chi lan Ngọc điểm *(Rhynchostylis Blume)* là một loài lan thường được trồng phổ biến nhất, ra hoa vào dịp Tết cổ truyền [26, 27]. Do đó, để bảo tồn và phát triển loài lan quý hiếm này không còn phương pháp nào khác là phải tiến hành nhân giống và nuôi trồng chúng ở quy mô lớn. Bui Van Le và đồng tác giả (1999) đã nghiên cứu tìm ra quy trình nhân lan đai châu hiệu quả từ mảnh cắt lát mỏng tế bào [28]. Đặc điểm quả Lan đai châu đỏ nói riêng và các loài lan khác là hạt không có nội nhũ, vì vậy trong điều kiện tự nhiên, hạt rất khó nảy mầm và phát triển thành cây con. Phương pháp truyền thống để nhân giống lan Đai châu là phương pháp tách chồi, tuy nhiên hệ số nhân rất thấp và cây có thể bị nhiễm bệnh trong quá trình tiếp xúc với các yếu tố bất lợi ngoài môi trường và thực tế cho hệ số nhân rất thấp [29]. Nhân nhanh *in vitro* được coi là phương pháp hữu hiệu nhất để bảo tồn nguồn gen và cung cấp số lượng cây giống lớn trong thời gian ngắn.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Loài Lan đai châu đỏ (*Rhynchostylis gigantea* (Lindley) Ridley) thuộc họ phong lan (*Orchidaceace)* được thu thập ở Vườn quốc gia Tam Đảo, Vĩnh Phúc. Sử dụng hạt sau khi thụ phấn được 09 tháng để làm vật liệu nuôi cấy khởi đầu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Lựa chọn đối tượng và cách khử trùng khi vào mẫu *in vitro* phù hợp

Sử dụng vật liệu vào mẫu chính là hạt lấy từ quả 9 tháng tuổi của giống lan đai châu đỏ. Các vật liệu thực vật này được khử trùng bằng ba công thức khác nhau. CT1: Javen 10%, CT2: Javen 10% + cồn 70% và CT3: Javen 10% + $HgCl_2$ 0,1% + cồn 70%.

Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và IBA lên khả năng tạo phôi soma từ protocorm

Sử dụng tổ hợp chất kích thích sinh trưởng BAP và IBA với nồng độ khác nhau để khảo sát khả năng tạo phôi soma từ protocorm. Theo dõi hai chỉ tiêu tỷ lệ tạo phôi soma/cụm protocorm và số phôi soma/1 protocorm hình thành sau 08 tuần.

Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và Kinetin lên khả năng tái sinh chồi

Nghiên cứu ảnh hưởng của tổ hợp BAP và kinetin lên khả năng hình thành chồi với 5 công thức môi trường khác nhau. ĐC: MS; SC1: MS +0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l kinetin; SC2: MS + 0,5 mg/l BAP + 0,3 mg/l kinetin; SC3: ĐC + 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin; SC4: 0,5 mg/l BAP + 0,7 mg/l kinetin.

Ảnh hưởng của nồng độ NAA lên khả năng phát sinh rễ của Lan Đai châu đỏ

Chồi sau khi được nhân với số lượng lớn được đặt trên môi trường MS có bổ sung NAA với nồng độ khác nhau (0; 0,5,1,0; 1,5; 2,0 mg/L) để theo dõi các chỉ tiêu: tỷ lệ ra rễ, số rễ/chồi, chiều dài và hình thái rễ.

Ảnh hưởng của thành phần giá thể lên khả năng sống sót và sinh trưởng của cây

Để đánh giá khả năng sống sót của cây nuôi cấy mô ra môi trường, chúng tôi tiến hành khảo sát trên các loại giá thể khác nhau: 100% xơ dừa, 100% giớn, 50% xơ dừa, 50% giớn trên dựa vào chỉ tiêu tỷ lệ sống sót của cây con sau 01 tháng trồng trên các giá thể khác nhau.

Môi trường sử dụng trong nghiên cứu này ở pH = 5,60 -5,80 có bổ sung 30 g glucose và 7 g/L agar. Môi trường được khử trùng ở 117^oC. Nuôi cấy cây ở nhiệt độ 25^oC ± 2^oC, chế độ sáng/tối mỗi ngày 16h/18h.

Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí 3 lần lặp lại.Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft exel 2007 [30].

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Khử trùng mẫu, tạo vật liệu khởi đầu in vitro

Khi sử dụng vật liệu để tạo vật liệu khởi đầu là hạt lấy từ quả 9 tháng tuổi của giống lan đai châu đỏ, vật liệu thực vật này được khử trùng bằng ba công thức khác nhau. CT1: Javen 10%, CT2: Javen 10% + cồn 70% và CT3: Javen 10% + $HgCl_2$ 0,1% + ethanol 70%. Đây là bước quyết định sự thành công của quy trình nhân giống đai châu đỏ, vì vật liệu phải có điều kiện sạch, khả năng tái sinh tốt thì mới có thể nhân nhanh được trong điều kiện *in vitro.*

Chúng tôi sử dụng quả lan đai châu đỏ 9 tháng tuổi, đây là dạng hạt bánh tẻ, có sức sống tốt nhất để vào mẫu, vì nếu sử dụng hạt quá non (2-4 tháng tuổi) hoặc hạt quá già (12-24 tháng tuổi đều cho kết quả tái sinh kém (kết quả không trình bày ở đây). Khi sử dụng quả lan đai châu đỏ để tiến hành khử trùng ở ba công thức khác nhau, chúng tôi thu được kết quả như bảng 1.1.

Bảng 1.1. Kết quả vào mẫu quả để sử dụng hạt lan đai châu đỏ nuôi cấy *in vitro*

Công thức khử trùng	Lô thí nghiệm	Số hạt ban đầu	Số mẫu sống sót/sạch	Tỷ lệ sống sót (%)	Trung bình ± SD
CT1	1	150	35	23,33	22,80± 0,94
	2	167	39	23,35	
	3	152	33	21,71	
CT2	1	134	42	31,34	31,23± 0,80
	2	122	39	31,97	
	3	158	48	30,38	
CT3	1	145	123	84,83	84,62± 1,48
	2	157	135	85,99	
	3	171	142	83,04	

Dựa vào kết quả ở bảng 1.1 cho thấy, công thức khử trùng tốt nhất đối với nguyên liệu là hạt lan là CT3, ở công thức khử trùng này cho tỷ lệ mẫu sống sót và sạch cao nhất, đạt 84,62%. Môi trường sử dụng Javen 10% có tỷ lệ mẫu sống sót/sạch thấp nhất: tỷ lệ mẫu sạch và sống sót chỉ đạt 22,8%, còn lại là nhiễm và chết.

3.2. Ảnh hưởng của tổ hợp các BAP và IBA lên khả năng tạo phôi soma từ protocorm

Hạt sau khi tiến hành vào mẫu từ hạt trên môi trường MS, sau nuôi cấy 60 ngày các hạt đều phát triển ở dạng protocorm. Để tạo chồi từ protocorm xuất phát từ hạt có hai giai đoạn: 1. Tạo phôi soma từ dạng protocorm; 2. Tái sinh chồi từ phôi soma.

Ảnh hưởng của BAP và IBA lên khả năng tạo phôi soma từ protocorm phát sinh từ hạt

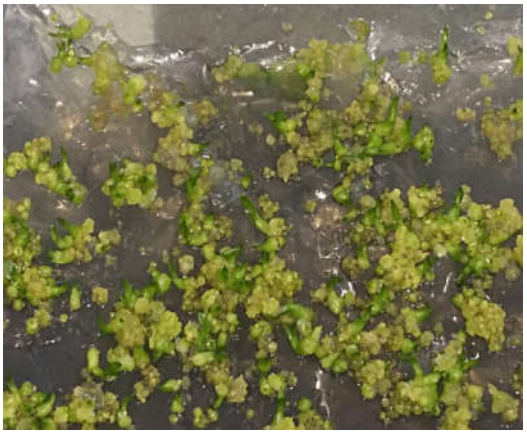
Phôi soma được coi như một phương pháp ưu việt nhất trong hệ thống nhân giống *in vitro* và công nghệ chuyển gen (Phan Thị Thu Hiền et al, 2015)[31]. Phôi soma được hình thành từ protocorm được công bố đầu tiên ở *Cymbidium* [32], *Phalaenopsis amabilis* var. formosa [33] và *Rhynchostylis gigantea* [34] . Gần đây, Naing et al., 2011 đã tạo phôi soma ở *Coelogyne cristata* [35]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu khả năng tạo phôi soma từ protocorm 60 ngày tuổi xuất phát từ hạt của giống lan đai châu đỏ, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của BAP và IBA lên khả năng hình thành phôi soma ở giống lan này. Kết quả thu được như bảng 1.2, hình 1.1.

Bảng 1.2. Ảnh hưởng của BAP và IBA lên số lượng phôi soma hình thành từ protocorm

Kí hiệu	Nồng độ KTST (mg/L)		Số protocorm ban đầu	Số protocorm tạo phôi soma	Tỷ lệ TB (%)	TB ± SD
	BAP	IBA				
			31	3	9,68	
SM1	0	0	32	3	9,38	9,38 ± 0,29
			33	3	9,09	
			41	6	14,63	
SM2	0,5	1	32	5	15,63	15,29 ± 0,57
			32	5	15,63	
			33	12	36,36	
SM3	1	1	32	12	37,50	37,52 ± 1,17
			31	12	38,71	
			35	14	40,00	
SM4	1,5	1	36	15	41,67	40,95 ± 0,86
			34	14	41,18	
			31	20	64,52	
SM5	2	1	33	21	63,64	63,55 ± 1,01
			32	20	62,50	
			41	12	29,27	
SM6	2,5	1	31	9	29,03	29,53 ± 0,68
			33	10	30,30	

Kết quả cho thấy, môi trường MS cơ bản (Đối chứng) cho tỷ lệ tạo phôi soma thấp nhất, đạt 9,38%. Tổ hợp chất kích thích sinh trưởng BAP và IBA có tác động rõ rệt lên sự hình thành phôi soma ở giống lan Đai châu đỏ, trên môi trường SM2 có bổ sung 0,5 mg/L BAP và 1 mg/L IBA, cho tỷ lệ tạo phôi soma cao xấp xỉ gấp 2 lần so với môi trường đối chứng. Môi trường có bổ sung 2 mg/L BAP và 1 mg/L IBA cho tỷ lệ tạo phôi ở các khối protocorm cao nhất, đạt xấp xỉ 63,55%. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Mahendran và Narmatha Bai (2012) khi nghiên cứu quá trình tạo phôi soma của loài lan *Cymbidium bicolor* Lindl. [36]. Trên môi trường MS cơ bản có bổ sung 2 mg/l BAP và 1 mg/L NAA cho tỷ lệ tạo phôi soma cao nhất, số phôi tạo thành/protocorm xấp xỉ 26. Công trình này còn sử dụng môi trường này để kéo dài chồi và tạo rễ cho chồi sau tái sinh.

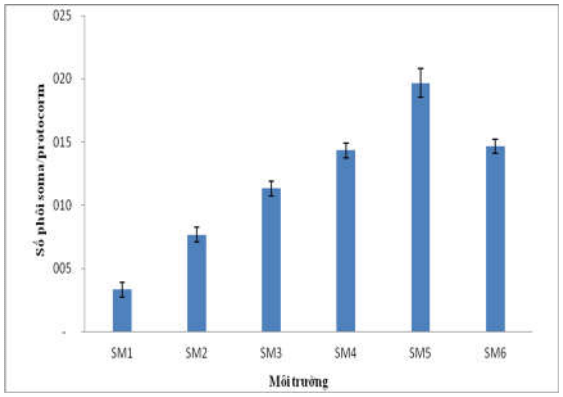
Hạt bắt đầu nảy mầm sau 02 tuần



Protocorm hình thành

Hình 1.1. Hạt nảy mầm thành protocorm.

Để nghiên cứu hiệu quả tạo phôi soma, chúng tôi tiếp tục khảo sát tác động của môi trường có bổ sung BAP và IBA nồng độ khác nhau lên số lượng phôi soma tạo thành/protocorm (Biểu đồ 1.1)



Biểu đồ 1.1. Ảnh hưởng của BAP và IBA đến số lượng phôi soma hình thành từ protocorm.

Dựa vào kết quả thể hiện ở biểu đồ 1.1 cho thấy, tổ hợp BAP và IBA tác động rõ rệt lên số lượng phôi tạo thành từ protocorm của giống lan đai châu đỏ. Cụ thể, trên môi trường SM1, không bổ sung hai chất này, chỉ cho 3,33 phôi soma/protocorm. Khi bổ sung tổ hợp hai chất kích thích sinh trưởng BAP và IBA đã cho thấy sự thay đổi rõ rệt. Môi trường SM2 cho thấy sự tạo thành phôi/protocorm đạt 7,67, gấp đôi môi trường SM1. Môi trường SM5 cho thấy sự hình thành số lượng phôi nhiều nhất, lượng phôi đạt 19,67 phôi/protocorm.

3.3. Ảnh hưởng của BAP và Kinetin lên khả năng hình thành chồi từ phôi soma

Từ dạng phôi soma của giống lan đai châu đỏ, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của tổ hợp BAP và kinetin lên khả năng hình thành chồi với 5 công thức môi trường khác nhau.

Bảng 1.3. Ảnh hưởng của BAP và Kinetin lên khả năng tái sinh chồi từ phôi soma của giống Lan Đai châu đỏ

Kí hiệu	Chất KTST (mg/L)		Số cụm phôi ban đầu	Số cụm phôi tái sinh	Tỷ lệ tái sinh (%)	Trung bình (%) ± SD
	BAP	Kinetin				
ĐC	0	0	31	2	6,45	6,25 ± 0,20
			33	2	6,06	
			32	2	6,25	
SC1	0,5	0,1	31	6	19,35	20,39 ± 0,95
			34	7	20,59	
			33	7	21,21	
SC2	0,5	0,3	32	10	31,25	30,99 ± 0,60
			33	10	30,30	
			35	11	31,43	
SC3	0,5	0,5	34	14	41,18	41,41 ± 0,92
			33	14	42,42	
			32	13	40,63	
SC4	0,5	0,7	34	12	35,29	37,40 ± 2,05
			32	12	37,50	
			33	13	39,39	
SC5	0,5	1	31	10	32,26	31,27 ± 0,98
			32	10	31,25	
			33	10	30,30	

Dựa vào kết quả thu được ở bảng 1.3 cho thấy, trên môi trường MS, tỷ lệ tái sinh đạt thấp, xấp xỉ 6,25%. BAP và Kinetin là hai nhóm chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm xytokinin, có tác dụng tăng cường sự phân bào, giúp các tế bào thực vật tăng sinh nhanh hơn, tạo điều kiện thuận lợi cho tái sinh (Hình 1.2).

Khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy BAP và kinetin với nồng độ khác nhau, hiệu quả tái sinh đã có sự thay đổi rõ rệt, ở môi trường SC1, sự tái sinh đã tăng lên 20,39%.

A B

Hình 1.2. Quá trình tái sinh của giống lan đai châu đỏ từ phôi soma.
A: Qúa trình diệp lục hóa của phôi soma, B: Chồi bắt đầu hình thành.

Tỷ lệ tái sinh đạt cao nhất ở môi trường SC3 có bổ sung 0,5 mg/L BAP và 0,5 mg/L Kinetin, tỷ lệ tái sinh đạt xấp xỉ 41,41%. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Ngô Xuân Bình (2010) [37], ông cũng đã chứng minh được khi bổ sung BAP và Kinetin sẽ kích thích được quá trình tái sinh của các protocorm phát triển từ hạt của các giống lan đai châu *in vitro*, tỷ lệ tái sinh đạt 40%, tương đương với kết quả của chúng tôi trong thí nghiệm này (hình 1.2).

3.4. Ảnh hưởng của nồng độ NAA lên khả năng phát sinh rễ của Lan Đai châu đỏ

Đối với nuôi cấy mô và tế bào thực vật, auxin được sử dụng để kích thích phân chia tế bào và phân hóa rễ. Những auxin thường dùng rộng rãi trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật là αNAA, IAA… [38].

Bảng 1.4. Ảnh hưởng của nồng độ NAA lên khả năng phát sinh rễ của Lan Đai châu đỏ

Kí hiệu	Nồng độ NAA (mg/L)	Tỷ lệ ra rễ TB %	Số rễ/chồi (%)	Chiều dài rễ TB (%)	Hình thái rễ
ĐC	0	11,00 ± 1,00	1,33 ± 0,58	1,33 ± 0,58	Nhỏ, yếu
RP1	0,5	21,17 ±1,61	1,33 ± 0,58	2,33 ± 0,58	Nhỏ, yếu
RP2	1	37,33 ± 2,52	3,00 ± 0	2,50 ± 0,10	Nhỏ, có lông tơ
RP3	1,5	50,67 ± 1,15	3,67 ± 0,58	3,30 ± 0,61	Mập, xanh, nhiều lông tơ
RP4	2	42,33 ± 0,58	2,33 ± 0,58	2,77 ± 0,21	Mập, xanh

Dựa vào kết quả bảng 1.4 cho thấy, chất kích thích sinh trường NAA có ảnh hưởng rõ rệt lên khả năng tạo rễ của giống lan đai châu đỏ. Trên môi trường đối chứng không bổ sung NAA, cây lan đai châu đỏ có phản ứng ra rễ nhưng tỷ lệ rất thấp, chỉ đạt xấp xỉ 11%, số rễ/chồi đạt 1,33, chiều dài xấp xỉ 1 cm.

Trên môi trường RP1, có bổ sung 0,5 mg/L NAA cho thấy khả năng tạo rễ của giống lan đạt 21,17%. Khi tăng nồng độ NAA lên 1,5 mg/L, cho thấy khả năng tạo rễ của giống lan đai châu đỏ *in vitro* đạt cao nhất, khoảng 50,67%, số rễ/chồi đạt 3,67 rễ, chiều dài trung bình đạt 3,3 cm, rễ mập, xanh, có nhiều lông tơ. Khi nồng độ NAA tăng lên 2 mg/L, tỷ lệ tạo rễ giảm chỉ còn 42,33%, chiều dài và số lượng rễ cũng giảm (Hình 1.3). Có hiện tượng này do nồng độ auxin tăng, làm ức chế quá trình ra rễ. Một số tác giả khác lại sử dụng chất IBA nồng độ 2 mg/L để tạo rễ cho loài lan *Coelogyne cristata* Lindl., cho số rễ đạt khá cao -15 rễ/cụm chồi [39].

E D C B A

Hình 1.3. Qúa trình tạo rễ của giống lan đai châu đỏ *in vitro* trên môi trường khác nhau. A: Đối chứng, B: ra rễ trên môi trường RP1, C: ra rễ trên môi trường RP2, D: ra rễ trên môi trường RP3, E: ra rễ trên môi trường RP4.

3.5. Ảnh hưởng của thành phần giá thể lên khả năng sống sót và sinh trưởng của cây

Để tăng được khả năng thích ứng của cây con với điều kiện bên ngoài, chúng tôi tiến hành huấn luyện cây con bằng cách đưa cây con trong ống nghiệm ra điều kiện vườn ươm trong 2 tuần trước khi tiến hành ra cây. Phương pháp này cũng phù hợp với Chen và Zeng khi cho ra cây 1 số giống lan [40, 41].

Cây sau nuôi cấy *in vitro,* cây concó bộ rễ hoàn chỉnh được chuyển ra vườn ươm. Tùy vào đặc tính của mỗi giá thể, cho tỷ lệ sống sót khác nhau. Giá thể xơ dừa có tác dụng giữ ẩm rất tốt, cho tỷ lệ sống sót ở giống lan này đạt 47,92%, tuy vậy, hàm lượng chất dinh dưỡng ở giá thể này thấp.

Giá thể giớn cho kết quả sống sót cao hơn, tỷ lệ sống của các cây con đạt 53,99%. Giá thể này có hàm lượng dinh dưỡng cao hơn so với xơ dừa tuy nhiên độ tơi xốp của giá thể này thấp (Bảng 1.5).

Bảng 1.5. Ảnh hưởng của thành phần giá thể lên khả năng sống sót và sinh trưởng của cây Lan Đai châu đỏ

Loại giá thể	Số mẫu ra cây	Số mẫu sống sót	Tỷ lệ sống sót	Tỷ lệ sống TB % ± SD
100 % xơ dừa	32	15	46,88	47,92±0,90
	33	16	48,48	
	31	15	48,39	
100 % giớn	32	18	56,25	53,99±1,96
	34	18	52,94	
	36	19	52,78	
50% giớn, 50% xơ dừa	38	38	100,00	98,41±1,38
	43	42	97,67	
	41	40	97,56	

Khi kết hợp 2 thành phần 50% giớn: 50% xơ dừa, cho tỷ lệ sống sót cao nhất đạt 98,41%. Hiệu quả cao do sự kết hợp cả giớn và xơ dừa, giúp môi trường ra cây vừa có hàm lượng dinh dưỡng và độ ẩm, độ xốp phù hợp (Hình 1.4).

Phạm Thị Kim Hạnh và đồng tác giả đã thực hiện ra cây giống lan đai châu sau khi nuôi cấy bằng kĩ thuật bioreactor, thành phần giá thể có sử dụng than củi, bọt núi lửa, dớn và xơ dừa, cho tỷ lệ sống sót cao nhất, đạt xấp xỉ 100%, tuy vậy có hiện tượng bị thối mềm lá, vàng lá [42]. Đinh Thị Dinh và đồng tác giả đã tiến hành nghiên cứu một số biện pháp kĩ thuật để tăng khả năng sinh trưởng của hoa lan đai châu

có sử dụng giá thể than hoa, vỏ cây, rong biển, tỷ lệ 1:1:1, tưới nước ngày 1 lần, giúp cây có sức sống và chống chịu tốt, tỷ lệ sống sót và sạch bệnh đạt 100% [43].

Hình 1.4. Các cá thể sống sót trên giá thể sau 8 tuần.

4. Kết luận

Đã thực hiện vào mẫu thành công vật liệu quả (hạt) của giống lan đai châu đỏ. Đã xác định được vật liệu khởi đầu hiệu quả nhất hạt của quả lan đai châu đỏ 09 tháng tuổi. Phương pháp khử trùng tốt nhất với công thức khử trùng bao gồm CT3 gồm Javen 10% + $HgCl_2$ 0,1% + ethanol 70%: tỷ lệ mẫu sạch và sống sót đạt cao nhất, đạt 41,41%.

Môi trường thích hợp để tạo phôi soma từ protocorm là môi trường MS cơ bản có bổ sung 2 mg/L BAP và 1 mg/L IBA. Trên môi trường này, tỷ lệ tạo phôi soma từ protocorm đạt xấp xỉ 63,55%, số phôi soma hình thành/protocorm đạt 19,67 phôi.

Môi trường thích hợp cho sự hình thành, phát triển chồi từ phôi soma là MS cơ bản có bổ sung 0,5 mg/L BAP và 0,5 mg/L kinetin, trên môi trường này, tỷ lệ tái sinh chồi đạt 41,41%.

Nồng độ NAA 1,5 mg/L tốt nhất để ra rễ *in vitro* cây lan đai châu đỏ, tỷ lệ ra rễ đạt 50,67%, số rễ trung bình 3,67, chiều dài rễ đạt 3,3 cm, rễ mập, xanh, có nhiều lông tơ.

Giá thể thích hợp nhất được bố trí trong thí nghiệm này là 50% giớn: 50% xơ dừa, cho tỷ lệ sống sót của cây con đạt 83,62%. Cây phát triển khỏe, không có sâu bệnh.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ từ nguồn kinh phí khoa học công nghệ của Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2 cho đề tài mã số: C.2016-18-02.

Tài liệu tham khảo

[1] Givnish TJ, Spalink D, Ames M, Lyon SP, Hunter SJ, Zuluaga A, Iles WJD, Clements MA, Arroyo MTK, Leebens-Mack J, Endara L, Kriebel R, Neubig KM, Whitten WM, Williams NH, Cameron KM, Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification, Proceedings of the Royal Society B 282(1814)(2015)1553.

[2] Moore D, On growing orchids from seeds, Gard.Chron 35 (1849) 549.

[3] Bernard N, Sur la germination de Neottia nidus-avis. C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Paris 128 (1899) 1253.

[4] Knudson L, Nonsymbiotic germination of orchid seeds, Bot. Gaz. 73 (1922) 1.

[5] Rotor JG. Amethod for vegetative propagation of Phalaenopsis species and hybrids, Am. Orchid Soc. Bull. 18 (1949) 738.

[6] Morel G, Producing virus-free cymbidiums.Am, Orchid Soc. Bull. 29 (1960.) 495.

[7] Lippe RS, GLOBALG.A.P Summit, Madrid. http://www.globalgap.org/export/sites/default/.content/.galleries/SUMMIT_2012/SUMMIT_2012_Presentations/8-Nov/8-Nov-Breakout-Session-Flowers/Lippe-8-11_14_30.pdf (Nov).

[8] Arditti J, Ernst R, Micropropagation of Orchids. Wiley-Interscience, New York (1993).

[9] Arditti J, Krikorian AD, Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators, Bot.J. Linn. Soc. 122 (1996) 183.

[10] Arditti J, Micropropagation of Orchids.second ed. Blackwell, Cambridge (1996).

[11] Teixeira da Silva JA, Chin DP., Van PT, Mii M, Transgenic orchids.Sci. Hortic.130 (2011) 673.

[12] Khoddamzadeh AA, Sinniah UR, Kadir MA, Kadzimin SB, Mahmood M.,Subramaniam S, Detection of somaclonal variation by random amplified polymorphic DNA analysis during micropropagation of Phalaenopsis bellina (Rchb.f.) Christenson, Afr. J. Biotechnol. 9 (2010.) 6632.

[13] Teixeira da Silva JA, Zeng S Galdiano Jr, RF, Dobránszki J, Cardoso JC, Vendrame WA, In vitro conservation of Dendrobim germplasm, Plant Cell Rep. 33 (2014): 1413.

[14] Roy J, Banerjee N, Induction of callus and plant regeneration from shoot tip explants of Dendrobium fimbriatum Lindl. var. Oculatum Hk.f, Sci. Hortic. 97 (2003) 333.

[15] Subramanium G, Taha RM, Morphogenesis of Cymbidium atropurpureum in vitro, Malays. J. Sci. 22 (2003) 1.

[16] Roy AR, Patel RS, Sajeev S, Deka C, Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of Vanda coerulea Griff ex. Lindle. (Blue Vanda): An in vitro protocol for an endangered orchid, Sci. Hortic. 128 (2011) 325.

[17] Nhut DT, Van Le B, Van Tran Thanh K, Thorpe T, Thin cell layer culture system: regeneration and transformation applications, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (2003): 23.

[18] Teixeira da Silva JA, Giang DTT, Chan MT, Sanjaya, Norikane A, Chai ML, Chico-Ruı ´z J, Penna S, Granstro ¨m T, Tanaka M The influence of different carbon sources, photohetero photoauto- and photomixotrophic conditions on protocorm-like body organogenesis and callus formation in thin cell layer culture of hybrid Cymbidium (Orchidaceae), Orchid Sci Bio-technol 1(2007):15.

[19] Lakshmanan P, Loh CS, Goh CJ An in vitro method for rapid regeneration of a monopodial orchid hybrid Aranda Deborah using thin section culture, Plant Cell Rep 14 (1995): 510.

[20] Naing AH, Chung JD, Park IS, Lim KB, Efficient plant regeneration of the endangered medicinal orchid, Coelogyne cristata using protocorm-like bodies, Acta Physiol Plant 33 (2011) 659.

[21] Liao YJ, Tsai YC, Sun YW, Lin RS, Wu FS, In vitro shoot induction and plant regeneration from flower buds in Paphio pedilum orchids, In Vitro Cell Dev Biol Plant 47 (2011) 702.

[22] Mulgund GS, Nataraja K, Malabadi RB, Kumar SV, TDZ induced in vitro propagation of an epiphytic orchid Xenikophy-ton smeeanum (Reichb. f.). Res Plant Biol 1 (2011)7.

[23] Wu K-L, Zeng S-J, Teixeira da Silva JA, Chen Z-L, Zhang J-X, Yang Y-S, Duan J, Efficient regeneration of Renanthera Tom Thumb 'Qilin' from leaf explants, Sci Hortic 135 (2012) 194.

[24] Nguyễn Thị Sơn, Từ Bích Thủy, Đặng Thị Nhàn, Nguyễn Thị Lý Anh, Hoàng Thị Nga, Nguyễn Quang Thạch, Nhân giống in vitro Lan Dendrobium officinale Kimura et Migo. (Thạch hộc Thiết bì, Tạp chí Khoa học và Phát triển 2014, tập 12, số 8 (2014) 1274.

[25] Vũ Ngọc Phượng, Thái Xuân Du, Trịnh Mạnh Dũng, Nhân giống vô tính phong lan in vitro ở điều kiện ánh sáng tự nhiên. Kỷ yếu Hội nghị khoa học - Công nghệ sinh học thực vật trong công tác nhân giống và tạo giống hoa. Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam & UBND Tỉnh Lâm Đồng, NXB Nông nghiệp (2015) 37.

[26] Trần Hợp, Phong lan Việt Nam. NXB Nông nghiệp (1998).

[27] Đinh Thị Dinh, Đặng Văn Đông, Trần Duy Qúy, Nghiên cứu một số biện pháp kỹ thuật tác động tăng khả năng sinh trưởng, chất lượng hoa lan đai châu (Rhynchostylis gigantea (Lindley) Ridley), Tạp chí nông nghiệp và phát triển nông thôn kỳ 2 (2014) 10.

[28] Bui van Le, N.T. Hang Phuong, L.T. Anh Hong, K. Tran Thanh Van, High frequency shoot regeneration from Rhynchostylis gigantean. Plant Growth Regulation 28 (1999) 179.

[29] Ngô Xuân Bình, Nghiên cứu ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng đến khả năng nẩy mầm và tạo chồi của hạt phong lan Đai Châu trong nhân giống in vitro, Tạp chí Hoạt động Khoa học (611) (2010): 32.

[30] Chu Văn Mẫn Tin học trong công nghệ sinh học, Nhà xuất bản giáo dục Việt Nam (2009).

[31] Phan Thị Thu Hiền, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Quy trình chuyển gen hiệu quả vào phôi soma của giống mía ROC22 (Saccharum officinarum L.) thông qua vi khuẩn Agrobacterium tumefaciens, Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Tập 31, Số 4S (2015) 108.

[32] Begum AA, Tamaki M, Kako S, Formation of protocorm-like bodies (PLBs) and shoot development through in vitro culture of outer tissue of Cymbidium PLB, J. Jpn. Soc.Hort.Sci. 63 (1994) 663.

[33] Chen JT, Chang C, Chang WC, Induction of repetitive embryogenesis from seed-derived protocorms of Phalaenopsis amabilis var. formosa shimadzu, In Vitro Cell. Dev. Biol.: Plant 40 (2004) 290.

[34] Li ZY, Xu L, In vitro propagation of white-flower mutant of Rhynchostylis gigantea (Lindl.) Ridl.Through immature seed-derived protocorm like bodies, J.Hort. Forest 1(2009) 93.

[35] Naing AH, Chung JD, Lim KB, Plant regeneration through indirect somatic embryogenesis in Coelogyne cristata orchid, Am. J. Plant Sci. 2 (2011), 262.

[36] Mahendran G., Narmatha Bai V, Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from seed derived protocorms of Cymbidium bicolor Lindl., Scientia Horticulturae 135 (2012) 40.

[37] Ngô Xuân Bình, Nghiên cứu ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng đến khả năng nẩy mầm và tạo chồi của hạt phong lan Đai Châu trong nhân giống in vitro, Tạp chí Hoạt động Khoa học (611) (2010): 32.

[38] Vũ Ngọc Lan, Nguyễn Thị Lý Anh, Nhân giống in vitro loài lan bản địa Dendrobium nobile Lindl, Tạp chí Khoa học và Phát triển 2013, tập 11, số 7 (2013): 917.

[39] Naing AH, Chung JD, Lim KB, Plant regeneration through indirect somatic embryogenesis in Coelogyne cristata orchid, Am. J. Plant Sci. 2 (2011): 262–267.

[40] Chen ZL, Ye XL, Liang CY, Duan J, Seed germination in vitro of Paphiopedilum armeniacum and P. micranthum, Acta Hortic Sin,31 (2004) 540.

[41] Zeng SJ, Wu KL, Teixeira da Silva JA, Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of Paphiopedilum wardii Sumerh., an endangered terrestrial orchid, Sci Hortic 138 (2012) 198.

[42] Phạm Thị Kim Hạnh, Đoàn Duy Thanh, Hà Thị Thúy, Đỗ Năng Vịnh, Kết quả nghiên cứu nhân nhanh in vitro giống lan Ngọc điểm Đai châu (Rhynchostylis gigantea) trong bioreactor, Tạp chí nông nghiệp và phát triển nông thôn 3 (2009) 46.

[43] Đinh Thị Dinh, Đặng Văn Đông, Trần Duy Qúy, Nghiên cứu một số biện pháp kỹ thuật tác động tăng khả năng sinh trưởng, chất lượng hoa lan đai châu (Rhynchostylis gigantea (Lindley) Ridley), Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn kỳ 2 (2014) 10.

In vitro propagation of (*Rhynchostylisgigantea* L.) orchid

Phan Thi Thu Hien, Nguyen Van Dinh

Faculty of Biology, Ha Noi Pedagogical University 2, Xuan Hoa, Phuc Yen, Vinh Phuc

Abstract: *Rhynchostylisgigantea* L. Orchid is an endangered tropical epiphytic orchid that is threatened with extinction due to over-collection and the loss of suitable habitats. *In vitro* propagation is a useful way to mass produce plants for re-establishment in the wild and for commercial propagation. Seeds collected 9 months after pollination were the optimum stage for *in vitro* culture. Seed germination reached 84,62 MS medium. Protocorms cultured on MS medium supplemented with auxin and cytokinin induced direct somatic embryogenesis. The best response was observed in protocorms cultured SM5- MS medium supplemented with BAP at 2.0 mg/L and IBA at 1.0mg/L. Complete plantlets were formed after 08 weeks culture on MS medium supplemented with 0.5 mg/l BAP and 0,5 mg/l Kinetin. MS medium supplemented with 0.5 mg/l BAP and 0,5 mg/l Kinetin and 20% CW was suitable for the regeneration in which the shoots proliferation ratio was 41,41%, the height of shoot was 4,33 cm after 08 weeks cultured. The shoot have 4 cm in height is subcultured on MS medium containing 1.5 mg/l NAA that was suitable for rooting 50,67%.. Plantlets with well-developed leaves and roots were transplanted to pots filled with *Sphagnum sp* dry and coir cartridge shell (1:1), also perlite individually and transferred to the greenhouse. Upon ex vitro transfer, 98,41% of plants survived in culture room condition (25 ± 2^{o}C). This protocol is an efficient means for the large-scale propagation and in vitro and *in vivo* germplasm conservation of *Rhynchostylisgigantea* L. orchid.

Keywords: Rhynchostylisgigantea L., propagation, in vitro, embryos soma, protocorm, potting medium.