

# **KHẢ NĂNG TẠO CHỒI TRỰC TIẾP TỪ LÁT MỎNG TRỰC PHÁT HOA NON CỦA CÂY LAN HỒ ĐIỆP *PHALAEENOPSIS AMABILIS***

**Vũ Thị Hải Yến - Võ Thị Bạch Mai**

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên

(Bài nhận ngày 08/09/2000)

**TÓM TẮT:** Các lát mỏng tế bào (1mm) từ trực phát hoa non (khoảng 10 mm) của cây phong lan Hồ Điệp *Phalaenopsis amabilis* có khả năng tạo chồi trên khắp bề mặt sau 7 tuần nuôi cấy trên môi trường MS được làm đặc với 6,8 g/l aga và được bổ sung 2% đường, 20% nước dừa, 10 mg/l ascorbic, 0,01 mg/l NAA và 5mg/l (hoặc 10mg/l) BA. Số lượng chồi / lát mỏng khá cao (>15chồi/lát mỏng) nhưng kích thước các chồi ban đầu nhỏ. Sau 11 tuần, chồi hình thành các lá hoàn chỉnh và có chiều cao 1,5 cm. Vùng phát sinh chồi từ lát mỏng được xác định là từ các tế bào nhu mô ở vùng vỏ và ở vùng sâu hơn bên trong.

## **ĐẶT VẤN ĐỀ**

Nuôi cấy mô đã được sử dụng như một phương tiện quan trọng trong việc nhân giống các loài lan từ nhiều năm nay. Tuy nhiên, cũng như các loài đơn tử diệp khác, không phải tất cả các loài lan đều có sự cảm ứng giống nhau trong cùng điều kiện nuôi cấy *in – vitro* (Bui Van Le, 1999 [3]). Thường sự tạo cây con diễn ra theo con đường tạo tiền củ (ở *Aranda deborah* (Goh và CSV, 1995 [4]). Một phương pháp tạo chồi trực tiếp không qua giai đoạn tạo tiền củ được tiến hành thành công trên loài lan *Rynchosstylis gigantea* (Bui Van Le, 1999 [3]) đã mở ra cho kỹ thuật nhân giống lan một phương pháp mới rất có ý nghĩa.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp nuôi cấy lớp mỏng trực phát hoa non của cây lan Hồ Điệp *Phalaenopsis amabilis* nhằm tạo một số lượng lớn chồi một cách nhanh chóng và trực tiếp. *Phalaenopsis amabilis* là một loài đơn thân có hoa to màu trắng, thường được sử dụng làm loài cha mẹ trong các nghiên cứu lai tạo các loài lan mới phong phú, đa dạng về màu sắc. Giá trị kinh tế do loài lan này mang lại cũng khá cao.

## **VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP**

### **Vật liệu**

Trực phát hoa non của cây phong lan Hồ Điệp *Phalaenopsis amabilis* (đài khoảng 10mm) được trồng trong nhà lưới của bộ môn Sinh Lý Thực Vật - Di Truyền ở điều kiện nhiệt độ  $28 \pm 2^{\circ} \text{C}$ , ẩm độ 60 – 80%, cường độ ánh sáng 1200 – 3000 lux.



## **Phương pháp**

Tách bỏ vảy bao bên ngoài phát hoa và khử trùng theo các bước sau : -Lau bề mặt mẫu vật bằng cồn 70<sup>0</sup>, lắc mẫu trong 20ml nước cất với 5giọt Mecryl laurylé 15 phút, rửa sạch mẫu và xử lý với Hypochlorid canxi 6% 20phút, cuối cùng rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần.

Mẫu được cắt thành những lát mỏng khoảng 1mm theo chiều ngang trục phát hoa và lắc trong nước cất vô trùng 10 phút.

Các mảnh cấy được nuôi trong các bình tam giác có dung tích 100ml với các môi trường có thành phần như sau.

MSO : MS + 2% đường +20% nước dừa + 6,8g/l agar + 10mg/l acid ascorbic.

MSA : MSO +0,01mg/l NAA + 5mg/l BA

MSB : MSO +0,01mg/l NAA + 10mg/l BA

MSC : MSO +0,01mg/l NAA + 2mg/l 2,4 – D + 2,5mg/l BA

MSA : MSO +0,01mg/l NAA + 2mg/l 2,4 – D + 5mg/l BA.

pH môi trường được chỉnh về 5,5 trước khi hấp khử trùng ở điều kiện nhiệt độ 121<sup>0</sup>C và áp suất 1 atm.

### **• Điều kiện nuôi cấy**

Tất cả các mảnh cấy được đặt nuôi ở điều kiện nhiệt độ 22 ± 2<sup>0</sup> C, ẩm độ 80%, trong tối hai tuần đầu nuôi cấy . Sau đó, chuyển mẫu cấy ra ngoài sáng với cường độ ánh sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ / ngày.

### **• Các chỉ tiêu theo dõi**

Sau 7 tuần nuôi cấy, xác định ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật trên sự phát sinh hình thái của mảnh cấy : Theo dõi những thay đổi về hình thái bên ngoài bằng mắt thường và những thay đổi cấu trúc tế bào bên trong mô cấy qua kính hiển vi quang học sau khi tiến hành giải phẫu và thực hiện sự nhuộm 2 màu (đỏ carmin và xanh iod).

## **KẾT QUẢ - THẢO LUẬN**

Sau 7 tuần, trên môi trường MSA và MSB, các chồi nhỏ li ti bắt đầu xuất hiện trên khắp bề mặt lát cắt (hình 1A). Sau 11 tuần, các chồi này hình thành lá hoàn chỉnh (hình 1B). Nếu vị trí lát cắt ngay vị trí chồi ngủ thì các chồi ngủ phát triển, đồng thời tạo cụm ở xung quanh. Auxin đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển chồi : Ở nồng độ thấp (thường cần phối hợp với cytokinin), auxin khởi phát mô phân sinh ngọn. Cytokinin tác động nên cả hai bước của sự phân chia tế bào : phân nhân và phân bào, trong sự hiện diện của auxin (Bùi Trang Việt, 1998 [5]). Sự phối hợp sử dụng auxin và cytokinin có tính chất định hướng cho sự hình thành cơ quan từ khối mô. Tỷ lệ auxin và cytokinin ngoại sinh hiện



diện trong hai môi trường MSA và MSB đã kích thích cho sự phân chia tế bào trong mô và sự phân hóa cơ quan hướng tạo chồi. Và có thể hàm lượng BA cao trong môi trường MSB so với môi trường MSA đã dẫn đến số lượng chồi /lát mỏng ở môi trường MSB nhiều hơn môi trường MSA. Như vậy, ở nồng độ cao, cytokinin kích thích sự tạo các sơ khởi chồi nhưng lại cản sự kéo dài của các sơ khởi này (Bùi Trang Việt, 1998 [5]).

Trên môi trường MSC và MSD, mẫu cấy chỉ có sự cảm ứng (thể hiện qua sự cong lên trên môi trường) mà không có sự phát sinh hình thái mới. Có lẽ, việc sử dụng 2,4 – D 2mg/l trên hai môi trường này không thích hợp cho sự tạo chồi mặc dù 2,4 – D được biết là chất ĐHSTTV thuộc nhóm auxin có vai trò quan trọng trong việc sinh phôi. Mẫu cấy cong lên có thể do sự phân chia không đồng đều của các tế bào ở hai bề mặt lát cắt trực phát hoa. Sự phân chia nhiều hơn của các tế bào mặt trên so với mặt dưới là nguyên nhân dẫn đến hiện tượng này.

Bên cạnh NAA và BA, nước dừa cũng ảnh hưởng quan trọng đến quá trình hình thành chồi ở loài lan biểu sinh như Hồ Điệp. Nước dừa đóng vai trò của chất hỗ trợ trong sự tạo chồi vì trong nước dừa hiện diện các vitamin, acid amin, một lượng đường tương đối cao, và các chất có hoạt tính tương tự cytokinin kích thích sự phân chia tế bào (Staden J. Van and Drewes S.E, 1974 [4]).

Do đặc tính tiết các hợp chất phenol ra ngoài môi trường rất nhiều khi bị thương nên các mảnh cấy của loài lan Hồ Điệp dễ bị gây độc do sự tác động của các sản phẩm của quá trình oxid hóa các hợp chất này. Vì vậy, trước khi nuôi cấy, chúng tôi đã lặc mẫu 10 phút trong nước cất vô trùng, để mẫu trong tối hai tuần đầu nuôi cấy, và sử dụng acid ascorbic để hạn chế hiện tượng trên.

Các nghiên cứu về nhân giống phong lan Hồ Điệp sử dụng phát hoa đã được tiến hành bởi Tanaka (1997) và Võ Thị Bạch Mai (1996). Các nghiên cứu này sử dụng mầm ngủ làm vật liệu và cho thấy có ba kiểu tăng trưởng tùy thuộc vào vị trí của các mầm ngủ này trên trục phát hoa. Việc sử dụng lát mỏng trực phát hoa không chỉ làm tăng số lượng mẫu cấy ( tận dụng được tối đa vật liệu thực vật ) mà còn tăng số lượng chồi/mẫu, đồng thời không gây tổn thương nghiêm trọng đến cây mẹ. Thường thì các lát mỏng dễ bị chết trong quá trình nuôi cấy nhưng chúng lại dễ dàng được định hướng bởi các chất chứa trong môi trường (trong khi đó, các mẫu cấy có kích thước lớn thì sự quân bình nội thường đã được xác định và môi trường chỉ có một ảnh hưởng hạn chế (Dương Công Kiên, [1]). Có thể các tế bào có khả năng phát sinh hình thái từ lát mỏng trực phát hoa đã thoát khỏi sự kiểm soát liên hợp (corellative) của khối mô và dưới điều kiện nuôi cấy thích hợp, chúng thể hiện được khả năng phát sinh hình thái (Goh và CSV, 1995 [2]).

Khi quan sát hình thái giải phẫu các lát mỏng tại vùng tạo chồi cho thấy : Vùng phát sinh chồi là từ các tế bào nhu mô của vùng vỏ và của vùng sâu hơn bên trong ( hình 2 ). Có lẽ, đặc điểm này cũng chính là một trong những lý do khiến cho lượng chồi tạo ra từ lát mỏng nhiều hơn so với trường hợp sử dụng các cơ quan khác.



## KẾT LUẬN

Từ kết quả đạt được, chúng tôi đưa ra một số kết luận sau :

- Các chồi có thể được tạo ra một cách nhanh chóng và trực tiếp trên bề mặt lát mỏng trực phát hoa non của cây phong lan Hồ Điệp *Phalaenopsis amabilis* với một số lượng lớn ( >15 chồi /lát mỏng ).

- Khả năng tạo chồi từ các lát mỏng trực phát hoa non của cây phong lan Hồ Điệp *Phalaenopsis amabilis* phụ thuộc vào kích thước mẫu cấy, việc phối hợp sử dụng auxin và cytokinin, sự tiết các hợp chất phenol từ mẫu cấy và đặc điểm phát sinh chồi từ lát mỏng (vùng phát sinh chồi được dẫn xuất từ các tế bào nhu mô ở vùng vỏ và ở vùng sâu hơn bên trong).



A. Sau 7 tuần nuôi cấy

Thanh ngang 2,86 mm



B. Sau 11 tuần nuôi cấy

Thanh ngang 2 mm

**Hình 1** : Chồi trên bề mặt lát mỏng trực phát hoa non của cây phong lan Hồ Điệp *Phalaenopsis amabilis*



**Hình 2**: Phẫu thức cắt dọc chồi trên bề mặt lát mỏng trực phát hoa của cây phong lan Hồ Điệp *Phalaenopsis amabilis*. Thanh ngang 61,1  $\mu\text{m}$



**ABILITY TO FORM BUDS DIRECTLY FROM THIN LAYERS OF THE YOUNG  
PHALAENOPSIS AMABILIS FLOWER STALK**

**Vu Thi Hai Yen – Vo Thi Bach Mai**

**ABSTRACT** : Thin cell layers (1mm) excised from the young flower stalk of *Phalaenopsis amabilis* (about 10mm) could form buds on the surface of the explants after 7 weeks being cultured on MS medium which was solidified with 6.8g/l agar and supplemented with 2% sugar, 20% Coconut Milk, 10mg/l acid ascorbic, 0.01mg/l NAA and 5mg/l (or 10mg/l) BA. The number of buds formed per thin layer was rather plentiful (>15 buds/thin layer) but these buds were small. After 11 weeks being cultured, they formed leaves and were high about 1.5cm. Bud primordia were formed from parenchymal cells of the cortex and of the inner area.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- [1] Dương Công Kiên. Hoa lan Orchideés : Kỹ thuật lai tạo và nhân giống. Hội hoa Lan cây cảnh TP.HCM. Trang 136-142
- [2] Lakshmanan P, Loh.C.S and Goh G.J. 1995. An *in-vitro* method of rapid regeneration of a monofodial orchid hybrid *Aranda deborah* using thin section culture. Plant cell reports, 14 : 510-514.
- [3] Le Bui Van, Hon NT. Anh and Van K. Tran Thanh. 1999. High frequency shoot regeneration from *Rhynchostylis gigantea* (Orchidaceae) using thin cell layers. Plant regulation, 00 :1-7.
- [4] Staden J . V and Drewes S.E. 1974. Identification cell division inducing compounds from Coconut Milk. Physiol Plant, 32 : 374-352.
- [5] Bùi Trang Việt.1998. Sinh Lý Thực Vật Đại Cương. Phần III : Phát triển, Ban xuất bản trường ĐHKNT, Đại học Quốc gia TP.HCM. 260 trang