

## NGHIÊN CỨU TẠO HẠT NHÂN TẠO CỦA CÂY ĐỊA LAN (*CYMBIDIUM MADRIT* "FOREST KING") PHỤC VỤ CÔNG TÁC NHÂN GIỐNG VÀ BẢO QUẢN

Trần Thị Ngọc Lan<sup>1</sup>, Hoàng Văn Cường<sup>1</sup>, Hoàng Xuân Chiến<sup>2</sup>, Nguyễn Bá Nam<sup>2</sup>, Nguyễn Du Sanh<sup>1</sup>, Dương Tấn Nhựt<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Viện Sinh học Tây Nguyên, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

### TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, hạt nhân tạo của cây Địa lan giống "Xanh chiều" (*Cymbidium Madrit* "Forest King"), một loại lan lai cho hoa bền và đẹp được hình thành từ các phôi sinh dưỡng hai tháng tuổi bọc trong dung dịch sodium alginate với các nồng độ khác nhau. Sau đó, các hạt này được nuôi cấy trên các hệ thống *in vitro* và *ex vitro*. Trong các thí nghiệm *in vitro*, phương pháp nuôi cấy thoáng khí không đường, không sử dụng chất điều hòa sinh trưởng, cho thấy là hệ thống hữu hiệu trong nuôi cấy hạt nhân tạo của cây Địa lan. Dung dịch sodium alginate với nồng độ 40 g/l là thích hợp cho hạt nhân tạo Địa lan. Khả năng nảy mầm và phát triển thành cây của hạt nhân tạo đạt 88,3% sau 3 tháng nuôi cấy. Cây con được nuôi cấy trong điều kiện không đường có khả năng thích nghi tốt khi nuôi trồng trong nhà kính với tỷ lệ sống sót là 100%, tạo được rễ mới sau 1 tháng nuôi trồng. Khi bảo quản ở môi trường lỏng không đường, 100% hạt sống sót sau 1 tháng và tỷ lệ nảy đạt 79,3% sau 6 tháng. Trong nuôi cấy *ex vitro*, hạt nhân tạo có khả năng tái sinh đạt tỷ lệ 35% khi sử dụng hạt có lớp vỏ không đường, không sử dụng chất điều hòa sinh trưởng. Đây là một triển vọng đầy hứa hẹn trong nhân giống Địa lan.

*Từ khóa* *Cymbidium*, hạt nhân tạo, nuôi cấy không đường, phôi sinh dưỡng, sodium alginate, tái sinh

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Khái niệm về hạt nhân tạo đã trở nên phổ biến khi phôi sinh dưỡng được bọc với lớp vỏ bọc thích hợp để có thể tái sinh và phát triển thành cây. Hạt nhân tạo có sự tương đồng với hạt từ hợp tử về mặt sinh lý, sinh hoá và tạo nên các cấu trúc mang phôi, được sử dụng như phương thức nhân dòng (Redenbaugh *et al.*, 1986). Lớp vỏ bọc hạt không làm hại đến phôi, bảo vệ phôi tránh những tác động cơ học của môi trường, hạt có khả năng nảy mầm và phát triển thành cây mà không có những biến dị không mong muốn. Vật liệu làm vỏ bọc phổ biến nhất để sản xuất hạt nhân tạo là sodium alginate với tính chất đông keo, dễ sử dụng, không độc và giá thành thấp. Đã có nhiều nghiên cứu về hạt nhân tạo trên các đối tượng như cỏ Linh lăng, Dầu tằm, Cà rốt, Cần tây, Thông trầm hương, Văn sam Norway (Bapat, 1991; Redenbaugh *et al.*, 1991; Redenbaugh, 1993). Sản xuất hạt nhân tạo đã mở ra những triển vọng mới cho công nghệ sinh học thực vật. Kỹ thuật này đã và đang phát triển một cách nhanh chóng để nghiên cứu tế bào và nuôi cấy mô thực vật (Datta *et al.*, 1999).

Lan - loại cây cảnh có giá trị nhưng khả năng sinh trưởng chậm và khó nhân giống bằng hạt. Việc sản

xuất hạt nhân tạo ở lan là phù hợp do hạt lan trong tự nhiên có phôi chưa phân hóa nên rất khó nảy mầm (Arditi, 1992). Cho đến nay, nghiên cứu hạt nhân tạo với các PLB (protocorm-like body) chỉ mới thực hiện trên một vài loài lan như *Dendrobium wardianum* Warner (Sharma *et al.*, 1992); *Cymbidium giganteum* Wall (Corrie, Tandon, 1993); *Spathoglottis plicata* (Singh, 1991); *Geodorum densiflorum* (Lam) Schltr (Datta *et al.*, 1999); *Oncidium* và *Cattleya* (Saiprasad, Polisetty, 2003); *Cymbidium* sp. (Nhut *et al.*, 2005); *Vanda coerulea* (Debojit *et al.*, 2010). Địa lan (*Cymbidium* sp.), một loại cây cảnh quý cho hoa bền, đẹp và có giá trị thương mại cao nhưng sinh trưởng chậm và khó nhân giống trong tự nhiên. Vì vậy, nhân giống Địa lan thường được thực hiện bằng con đường nuôi cấy mô thực vật với quá trình nhân giống liên tục và định kỳ vô mẫu lại ban đầu. Nghiên cứu hạt nhân tạo Địa lan đã được trình bày bởi Nhut và đồng tác giả (2005) nhưng sử dụng vật liệu chất mầm là PLB. Sử dụng phôi sinh dưỡng có tính toàn năng độc lập và có tiềm năng sinh trưởng cao làm vật liệu trong nghiên cứu hình thành hạt nhân tạo, nuôi cấy trong điều kiện *in vitro* không sử dụng đường, gieo trồng *ex vitro* và bảo quản hạt nhân tạo là mục đích chính trong công tác nhân giống và bảo tồn chất lượng giống Địa lan.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Đối tượng nghiên cứu là cây Địa lan giống "Xanh Chiêu" (*Cymbidium Madrit "Forest King"*).

Trong nghiên cứu này, nguyên liệu được dùng để sản xuất hạt nhân tạo là phôi sinh dưỡng được hình thành từ mô sẹo của cây Địa lan giống "Xanh Chiêu" (*Cymbidium Madrit "Forest King"*) trên môi trường SH (Schenk, Hildebrandt, 1972) bổ sung 2 g/l than hoạt tính, 50 g/l sucrose, 8 g/l agar, không sử dụng chất điều hòa sinh trưởng và chỉnh pH về 5,7. Chọn các phôi có đường kính 3 mm làm vật liệu tạo hạt nhân tạo (Hình 1a).

Phần nội nhũ nhân tạo được làm giàu bởi môi trường MS (có hay không có bổ sung đường tùy mục đích thí nghiệm).

Bột sodium alginate dùng để tạo gel và dung dịch  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  100 mM giúp tạo lớp vỏ cứng cho hạt.

### Phương pháp

#### *Chuẩn bị các loại môi trường và giá thể*

##### *Dung dịch vỏ alginate*

Pha 100 ml môi trường MS (có hay không có bổ sung đường tùy mục đích thí nghiệm), không  $\text{Ca}^{2+}$ . Chỉnh pH môi trường về 5,7. Thêm vào bột sodium alginate ở nồng độ 30 g/l, 40 g/l hoặc 50 g/l tùy mục đích thí nghiệm, đun cách thủy cho đến khi tan hết alginate.

##### *Dung dịch $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mM*

Cân 1,47 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , hòa tan trong 100 ml nước cất.

##### *Môi trường tái sinh cây*

Môi trường MS bổ sung 1 g/l than hoạt tính, 8 g/l agar; môi trường này có hoặc không có bổ sung đường tùy mục đích thí nghiệm. Chỉnh pH môi trường về 5,7.

Tất cả các dung dịch được hấp khử trùng ở 121°C (1 atm) trong 15 phút.

##### *Quy trình tạo hạt nhân tạo*

Phôi sinh dưỡng của cây Địa lan được cho vào dung dịch tạo vỏ alginate. Sử dụng pipette để hút hỗn hợp trên và nhỏ thành giọt vào dung dịch  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  100 mM. Sau 30 phút, các hạt nhân tạo

được tạo thành (Hình 1b) và được rửa 3 lần bằng nước cất vô trùng.

### *Điều kiện thí nghiệm*

Thí nghiệm được thực hiện tại phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo Giống cây trồng thuộc Viện Sinh học Tây Nguyên với điều kiện:

Điều kiện phòng nuôi cây: thời gian chiếu sáng là 10 giờ/ngày với cường độ chiếu sáng là 45  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Nhiệt độ phòng sáng là 25 ± 2°C và ẩm độ trung bình là 75 - 80%.

Điều kiện ngoài vườn ươm: điều kiện tự nhiên trong nhà ươm của Viện Sinh học Tây Nguyên.

### Các thí nghiệm

#### *Khảo sát sự sinh trưởng của hạt nhân tạo Địa lan trong các điều kiện in vitro và ex vitro*

*Ảnh hưởng của nồng độ sodium alginate trong vỏ hạt lên khả năng sinh trưởng của hạt nhân tạo Địa lan trong điều kiện nuôi cấy in vitro*

Hạt nhân tạo Địa lan với các vỏ bọc có nồng độ sodium alginate khác nhau (30, 40, 50 g/l) được nuôi cấy trên môi trường MS không đường, bổ sung 1 g/l than hoạt tính, 8 g/l agar và chỉnh pH về 5,7. Hạt được nuôi cấy trong các bình thủy tinh 250 ml chứa 40 ml môi trường nuôi cấy với nút bông có nắp đậy giấy lọc. Kết quả thí nghiệm được thu nhận sau 3 tháng nuôi cấy. Mỗi nghiệm thức được cấy 10 bình với mật độ 10 hạt/bình và được lặp lại 3 lần.

#### *Khả năng sinh trưởng in vitro của hạt nhân tạo Địa lan với các điều kiện nuôi cấy khác nhau*

Hạt nhân tạo có vỏ bọc sodium alginate với nồng độ 40 g/l được nuôi cấy trên 4 điều kiện nuôi cấy khác nhau: môi trường MS không đường, bổ sung 1 g/l than hoạt tính và 8 g/l agar với nắp đậy bằng nylon (A1); môi trường MS bổ sung 30 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính và 8 g/l agar với nắp đậy bằng nylon (A2); môi trường MS không đường, bổ sung 1 g/l than hoạt tính và 8 g/l agar với nút bông có nắp đậy giấy lọc (A3) và môi trường MS bổ sung 30 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính và 8 g/l agar với nút bông có nắp đậy giấy lọc (A4). pH của các môi trường được điều chỉnh đến giá trị 5,7. Kết quả được thu nhận sau 3 tháng nuôi cấy. Hạt được nuôi cấy trong các bình thủy tinh 250 ml chứa 40 ml môi trường nuôi cấy. Mỗi nghiệm thức được cấy 10 bình với mật độ 10 hạt/bình và được lặp lại 3 lần.

### *Khả năng thích nghi của cây con từ hạt nhân tạo Địa lan nuôi cấy in vitro*

Các cây con từ hạt nhân tạo sau khi được nuôi cấy *in vitro* ở 4 điều kiện nuôi cấy trên được chuyển ra nhà kính, trồng trên giá thể dớn; theo dõi khả năng sống sót và ra rễ mới của cây. Kết quả được thu nhận sau 1 tháng nuôi trồng.

### *Nuôi trồng hạt nhân tạo Địa lan trong điều kiện ex vitro*

Song song với các thí nghiệm *in vitro*, thí nghiệm *ex vitro* tạo 2 loại hạt nhân tạo với lớp vỏ bọc có bổ sung 40 g/l sodium alginate trong môi trường MS không đường (B1) và trong MS có 30 g/l sucrose (B2). Các hạt này được trồng trên giá thể dớn và trồng với 1/2 nằm trên mặt dớn trong các hộp nhựa polyethylene (Hình 1f). Mỗi hộp chứa 10 hạt và được đặt trong bao nylon để giữ ẩm. Mỗi thí nghiệm thực gồm 10 hộp và được lặp lại 3 lần. Kết quả được thu nhận sau 3 tháng nuôi trồng cho thấy, tất cả các cây con từ hạt nhân tạo đều sống sót.

### *Bảo quản hạt nhân tạo*

#### *Ảnh hưởng của các thể tích dung dịch bảo quản lên khả năng sống sót của hạt nhân tạo Địa lan*

Hạt nhân tạo có vỏ bọc sodium alginate với nồng độ 40 g/l được bảo quản trong dung dịch MS bổ sung 1 g/l than hoạt tính, chỉnh pH về 5,7 với các thể tích dung dịch khác nhau: 5, 10, 20 ml (trong các bình thủy tinh có thể tích 100 ml với mật độ 40 hạt cho mỗi bình bảo quản, mỗi thí nghiệm thực là 5 bình) và thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Các hạt được bảo quản ở nhiệt độ phòng ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) với độ ẩm trung bình là 75 - 80%, cường độ chiếu sáng là  $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  và thời gian chiếu sáng là 10 giờ/ngày trong 6 tháng. Sau đó, xác định thể tích dung dịch bảo quản phù hợp nhất cho việc bảo quản hạt nhân tạo Địa lan.

Sự sống sót của hạt nhân tạo Địa lan sau thời gian bảo quản được đánh giá bằng phương pháp thử Topogaphical Tetrazolium (TZ) trong điều kiện không có ánh sáng (Lakon, 1948). Lấy ngẫu nhiên 100 hạt từ mỗi thí nghiệm, tách phôi, chế đổi qua định và ngâm trong dung dịch 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride không màu có nồng độ 1% (1 g/100 ml nước cất, chỉnh pH về 7,0) trong 1 giờ ở  $30^\circ\text{C}$  và quan sát sự hình thành của phức chất màu đỏ (triphenylformazan) trong các phôi này.

Tỷ lệ hạt sống sót được đánh giá bằng số hạt xử lý với dung dịch 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride 1% có phản ứng màu đỏ của triphenylformazan trên

tổng số hạt được bảo quản tương ứng với mỗi loại thể tích dung dịch bảo quản.

### *Khả năng sinh trưởng trong điều kiện in vitro của hạt nhân tạo Địa lan sau thời gian bảo quản*

Hạt nhân tạo được bảo quản trong dung dịch MS bổ sung 1 g/l than hoạt tính và có pH bằng 5,7, thể tích của dung dịch bảo quản là 10 ml/bình thủy tinh 100 ml, mật độ 40 hạt/bình với thời gian bảo quản 1 tháng, 3 tháng và 6 tháng ở nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  và độ ẩm trung bình là 75 - 80%, cường độ chiếu sáng là  $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  và thời gian chiếu sáng là 10 giờ/ngày. Sau thời gian bảo quản, các hạt được nuôi cấy trong các bình thủy tinh 250 ml chứa 40 ml môi trường MS không đường, bổ sung 1 g/l than hoạt tính và 8 g/l agar với nút bông có nắp đậy giấy lọc (A3). Nuôi cấy với mật độ 10 hạt/bình với mỗi thí nghiệm thực 10 bình. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Thí nghiệm không sử dụng chất điều hòa sinh trưởng. Số liệu thu nhận sau 3 tháng nuôi cấy.

### *Chỉ tiêu theo dõi*

Chỉ tiêu theo dõi ở các thí nghiệm là tỷ lệ hạt sống sót, tỷ lệ hạt nảy chồi, tỷ lệ hạt ra rễ trên tổng số hạt khảo sát cũng như chiều dài chồi và chiều dài rễ của các hạt này.

### *Phương pháp xử lý số liệu*

Số liệu được phân tích bằng phép thử Duncan ( $P = 0,05$ ) với phần mềm xử lý thống kê SPSS 16.0.

## KẾT QUẢ

### *Ảnh hưởng của nồng độ sodium alginate trong vỏ hạt lên khả năng sinh trưởng của hạt nhân tạo Địa lan trong điều kiện nuôi cấy in vitro*

Tỷ lệ sống sót, tỷ lệ hình thành chồi, tỷ lệ ra rễ cũng như sự phát triển của chồi và rễ của hạt nhân tạo Địa lan sau 3 tháng nuôi cấy được thể hiện qua bảng 1. Các hạt nhân tạo Địa lan có tỷ lệ sống sót cao (100%) với phôi màu xanh, phần lớn đều nhú chồi và ra rễ. Hạt nhân tạo Địa lan có tỷ lệ hình thành chồi cao nhất ở nồng độ sodium alginate 30 g/l và 40 g/l, tương ứng lần lượt là 82,3% và 89%. Chiều cao chồi, chiều dài rễ của hạt nhân tạo Địa lan ở nồng độ sodium alginate 40 g/l là 9,67 mm và 3,07 mm tuy thấp hơn so với chiều cao chồi và chiều dài rễ của hạt ở nồng độ 30 g/l nhưng sự sai khác này không đáng kể. Tỷ lệ ra rễ cao nhất là 59,3% cũng ở nồng độ sodium alginate 40 g/l. Ở nồng độ sodium alginate 50 g/l, tỷ lệ hình thành chồi và tỷ lệ ra rễ của

hạt nhân tạo Địa lan là thấp nhất (tương ứng lần lượt là 55,7% và 12,3%); chiều cao chồi và chiều dài rễ cũng thấp hơn so với hai nồng độ còn lại (5,83 mm và 1,67 mm); điều đó có thể là do lớp vỏ hạt cứng, không thuận lợi cho sự phát triển của hạt. Như vậy, nồng độ sodium alginate đã ảnh hưởng đến quá trình phát sinh hình thái, nảy mầm và phát triển của hạt nhân tạo Địa lan.

Nồng độ sodium alginate 40 g/l cũng được xem là nồng độ thích hợp cho hạt nhân tạo từ PLB của *Geodorum densiflorum* (Datta *et al.*, 1999) và hạt nhân tạo từ PLB của *Cymbidium* sp. (Nhut *et al.*, 2005). Tương tự như kết quả trong nghiên cứu này. Điều đáng chú ý, kết quả khá quan trọng đạt được là trong thí nghiệm này trên môi trường nuôi cấy thoáng khí,

không dùng đường và không dùng chất điều hòa sinh trưởng. Đây có thể là phương pháp thích hợp trong nuôi cấy hạt nhân tạo.

Như vậy, vai trò của lớp vỏ bọc hạt rất quan trọng trong khả năng sống sót của hạt. Với lớp vỏ hydrogel đã tạo cho sodium alginate trở thành một vật liệu khá tốt trong thành phần của lớp vỏ bọc. Trong nghiên cứu của Nhut và đồng tác giả (2005) đã sử dụng  $\alpha$ -naphthaleneacetic (NAA) để kích thích hạt nhân tạo từ PLB của *Cymbidium* sp. ra rễ. Nghiên cứu này sử dụng phôi sinh dưỡng làm chất mầm tạo hạt nhân tạo, không sử dụng chất điều hòa sinh trưởng, kết quả đã thể hiện được tính toàn năng độc lập, có khả năng nảy mầm và phát triển thành cây của phôi sinh dưỡng Địa lan.

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của nồng độ sodium alginate lên khả năng sinh trưởng của hạt nhân tạo Địa lan "Xanh Chiếu" sau 3 tháng nuôi cấy

Nồng độ sodium alginate (g/l)	Tỷ lệ sống sót (%)	Tỷ lệ hình thành chồi (%)	Chiều cao chồi (mm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều dài rễ (mm)
30	100%	82,33a*	10,57a	27,00b	3,63a
40	100%	89,00a	9,67a	59,33a	3,07a
50	100%	55,67b	5,83b	12,33c	1,67b

\*Các mẫu tự khác nhau (a, b, ...) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với  $P = 0,05$  bằng phép thử Duncan.

### Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng và thích nghi của hạt nhân tạo Địa lan

Tỷ lệ sống sót, tỷ lệ hình thành chồi, tỷ lệ ra rễ cũng như sự phát triển của chồi và rễ của hạt nhân tạo Địa lan thu nhận sau 3 tháng nuôi cấy được thể hiện qua bảng 2. Tỷ lệ hình thành chồi và tỷ lệ ra rễ cao nhất ở điều kiện nuôi cấy bỏ sung đường với nút bông có nắp đậy giấy lọc (A4) tương ứng lần lượt là 89,7% và 80%. Ở điều kiện nuôi cấy không đường với nút bông có nắp đậy giấy lọc (A3), tỷ lệ hình thành chồi và tỷ lệ ra rễ cũng khá cao, tương ứng lần lượt là 88,3% và 74% (Hình 1c). Sự sinh trưởng của chồi và rễ trong điều kiện nuôi cấy không đường với nút bông có nắp đậy giấy lọc (A3) thấp hơn so với trong điều kiện nuôi cấy có đường với nút bông có nắp đậy giấy lọc (A4) nhưng sự sai khác này không đáng kể. Sự hình thành chồi và hình thành rễ thu được thấp nhất ở điều kiện nuôi cấy không đường với nắp đậy nylon (A1) tương ứng lần lượt là 9,3% và 6,3%. Như vậy, đối với điều kiện nuôi cấy, nắp đậy nylon đã làm cản trở sự lưu thông khí, việc bổ sung đường là cần thiết cho sự sinh trưởng và phát

triển của hạt nhân tạo Địa lan.

Đường là yếu tố quan trọng trong quá trình trao đổi chất của mô thực vật ở điều kiện nuôi cấy không thông khí và là nguồn năng lượng trong nuôi cấy mô lan (Teixeira *et al.*, 2007). Nghiên cứu của Nhut và đồng tác giả (2005) cho thấy, trên môi trường không đường với nắp đậy nylon, tỷ lệ ra rễ của hạt nhân tạo từ PLB rất thấp (2 - 5,5%). Kết quả tương tự cũng xảy ra ở điều kiện nuôi cấy hạt nhân tạo từ phôi sinh dưỡng (không đường với nắp đậy nylon). Điều đó có thể là do nuôi cấy thoáng khí sử dụng nút bông có nắp đậy giấy lọc đã làm giảm khả năng trao đổi khí và làm cho hạt sinh trưởng và phát triển tốt hơn.

### Khả năng thích nghi của cây con từ hạt nhân tạo Địa lan nuôi cấy *in vitro*

Trong điều kiện không dùng đường, cây con có thể thích nghi với khả năng quang tự dưỡng. Trong sản xuất và nhân giống, khả năng thích ứng với các điều kiện trong tự nhiên của cây nuôi cấy trong điều kiện *in vitro* là quan trọng nhưng tỷ lệ sống sót của cây con thường thấp. Thay đổi môi trường *in vitro* là giải pháp cho vấn đề này. Các công trình nghiên cứu

của Kozai về việc gia tăng hàm lượng CO<sub>2</sub> và cường độ ánh sáng trong nuôi cấy không sử dụng đường đã gia tăng tỷ lệ sinh trưởng của cây con trong đó có *Cymbidium* (Kozai et al., 1987). Những thí nghiệm của Kirdmanee và đồng tác giả (1995) trên cây *Eucalyptus camaldulensis* trong vi nhân giống quang tự dưỡng, sử dụng vermiculite như là giá thể hỗ trợ đã có 100% cây con sống sót khi chuyển chúng từ điều kiện *in vitro* sang điều kiện *ex vitro*. Trong khi đó, chỉ có 55% cây con sống sót khi nuôi cấy trong điều kiện có đường với giá thể là agar. Các tác động tương tự cũng xảy ra ở đối tượng *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit (Zhan et al., 2009). Như vậy, phương pháp nuôi cấy thoáng khí không bổ sung đường đã giúp cho cây quen với điều kiện tự dưỡng trong tự nhiên.

Các cây con khi nuôi cấy *in vitro* trên môi trường không bổ sung đường thường dễ thích nghi hơn với các điều kiện ngoài tự nhiên. Điều này đã được xác nhận khi chuyển tất cả các cây con từ hạt

nhân tạo Địa lan trong điều kiện *in vitro* ra trồng trong nhà kính với giá thể dớn và kết quả được thể hiện qua bảng 3. Cây con có nguồn gốc từ điều kiện nuôi cấy không đường với nút bông có nắp đậy giấy lọc (A3) cho tỷ lệ sống sót là cao nhất (100%), tỷ lệ ra rễ mới cũng đạt cao nhất (89%). Chiều cao chồi cũng tương đương với chiều cao chồi của cây nuôi cấy trong môi trường có đường (14 mm và 15,87 mm) và chiều dài rễ mới là cao hơn cả (4,17 mm) (Hình 1d). Trong khi đó, cây nuôi cấy trong điều kiện có đường với nắp đậy nylon (A2) thì tỷ lệ sống sót thấp nhất (58%), dễ bị nhiễm nấm, tỷ lệ ra rễ mới và chiều dài của rễ mới cũng thấp hơn so với ở các điều kiện khác (36,8% và 1 mm).

Như vậy, phương pháp nuôi cấy trong điều kiện không đường với nút bông có nắp đậy giấy lọc có thể là một triển vọng trong nhân giống hạt nhân tạo Địa lan với chất mầm là phôi sinh đường do bản chất của cây Địa lan là sinh trưởng chậm và khó nhân giống bằng hạt hợp tử.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng của hạt nhân tạo Địa lan “Xanh Chiều” sau 3 tháng nuôi cấy.

Điều kiện nuôi cấy	Tỷ lệ sống sót (%)	Tỷ lệ hình thành chồi (%)	Chiều cao chồi (mm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều dài rễ (mm)
A1	100%	9,33b*	1,33b	6,33c	0,63b
A2	100%	86,33a	12,00a	63,33b	4,57a
A3	100%	88,33a	9,00a	74,00ab	3,70a
A4	100%	89,67a	14,67a	80,00a	5,73a

\*Các mẫu tự khác nhau (a,b, ...) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với P = 0,05 bằng phép thử Duncan.

**Bảng 3.** Khả năng thích nghi của hạt nhân tạo Địa lan khi nuôi trồng trong điều kiện nhà kính sau 1 tháng nuôi trồng.

Cây con từ điều kiện nuôi cấy	Tỷ lệ sống sót (%)	Chiều cao chồi (mm)	Tỷ lệ ra rễ mới (%)	Chiều dài rễ mới (mm)
A1	62,33c*	5,33b	44,83b**	1,67b
A2	58,00c	13,33a	36,78b	1,00b
A3	100,00a	14,00a	89,00a	4,17a
A4	78,00b	15,87a	77,67a	4,00a

\*Các mẫu tự khác nhau (a,b,...) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với P = 0,05 bằng phép thử Duncan.

\*\*Số hạt nhân tạo hình thành rễ mới trên tổng số hạt sống sót

### Nuôi trồng hạt nhân tạo Địa lan trong điều kiện *ex vitro*

Kết quả về tỷ lệ nhiễm, tỷ lệ hạt sống sót, hình thành chồi và ra rễ của hạt nhân tạo Địa lan trong

điều kiện *ex vitro* trong thí nghiệm này được thể hiện qua bảng 4. Trong trường hợp lớp vỏ bọc không đường (B1), tỷ lệ nhiễm nấm khá thấp, hạt sinh trưởng khá tốt. 35% số hạt có khả năng sống sót với tỷ lệ hình thành chồi và tỷ lệ ra rễ tương ứng lần lượt

là 38,6% và 33,3%. Ở hạt có lớp vỏ bọc có đường (B2), tỷ lệ nhiễm nấm cao (74,7%) nhưng các cây sống sót đều có khả năng hình thành chồi và ra rễ (tỷ lệ tương ứng là 29,6% và 25,7%) (Hình 1f<sub>1</sub>, 1f<sub>2</sub>). Những cây này tiếp tục phát triển trong điều kiện tự nhiên với chồi và rễ sinh trưởng tốt. Không có các biến đổi về hình thái được quan sát ở các cây con từ hạt nhân tạo sau 6 tháng nuôi trồng (Hình 1f<sub>1</sub>, 1f<sub>2</sub>). Như vậy, hạt nhân tạo Địa lan có thể nảy mầm, phát triển thành cây, không cần sử dụng chất điều hòa sinh trưởng. Với những kết quả đạt được này cho thấy tiềm năng của phối sinh đường, sinh tương có tính toán năng độc lập trong hạt nhân tạo. Đây sẽ là triển vọng cây hứa hẹn trong nhân giống Địa lan, một loại hoa có giá trị.

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về vấn đề đưa hạt trực tiếp ra ngoài vườn ươm như Datta và

đồng tác giả (1999) sử dụng chất bảo quản thực phẩm sodium bicarbonate làm chất bọc bên ngoài, Nhut và đồng tác giả (2005) sử dụng chất kháng nấm là chitosan. Các kết quả cho thấy, tỷ lệ sống sót và nảy mầm của hạt thấp hơn 40%. Theo nghiên cứu của Tiên và đồng tác giả (2010) cho thấy với lớp vỏ bọc hai lớp alginate-chitosan thì tỷ lệ hạt nhiễm nấm thấp nhất là 27,3% với nồng độ chitosan trong lớp vỏ hạt 10 g/l nhưng không có hạt nào sống sót, với lớp vỏ bọc hai lớp alginate-alginate thì tỷ lệ hạt sống sót cao (90%) nhưng tỷ lệ hạt tái sinh rất thấp (4%). Điều này có thể do dung môi hòa tan chitosan là acid nên không tốt cho chất mầm của hạt, nếu rửa hạt không kỹ, các acid này sẽ thâm thấu vào trong và gây chết hạt, nếu rửa hạt quá lâu thì lớp chitosan có thể bị mài đi và làm cho hạt nhiễm nấm. Vì vậy, hạt nhân tạo trong thí nghiệm trên không tái sinh mà bị chết.

**Bảng 4.** Khả năng sinh trưởng của hạt nhân tạo Địa lan "Xanh Chiều" trong điều kiện *ex vitro* sau 3 tháng nuôi trồng.

Hạt nhân tạo và lớp vỏ bọc	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ hạt sống sót (%)	Tỷ lệ hình thành chồi (%)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Sự sinh trưởng và phát triển của cây	
					Chiều cao chồi (mm)	Chiều dài rễ (mm)
B1	25,67b*	35,00b	38,64b**	33,32b**	2,67a	2,15b
B2	74,67a	25,33b	29,58b	25,67b	3,00a	1,78b

\* Các mẫu tự khác nhau (a, b, ...) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với P = 0.05 bằng phép thử Duncan. \*\* Số hạt hình thành chồi (hay rễ) trên tổng số hạt có khả năng sống sót

#### Ảnh hưởng của các thể tích dung dịch bảo quản lên khả năng sống sót của hạt nhân tạo Địa lan

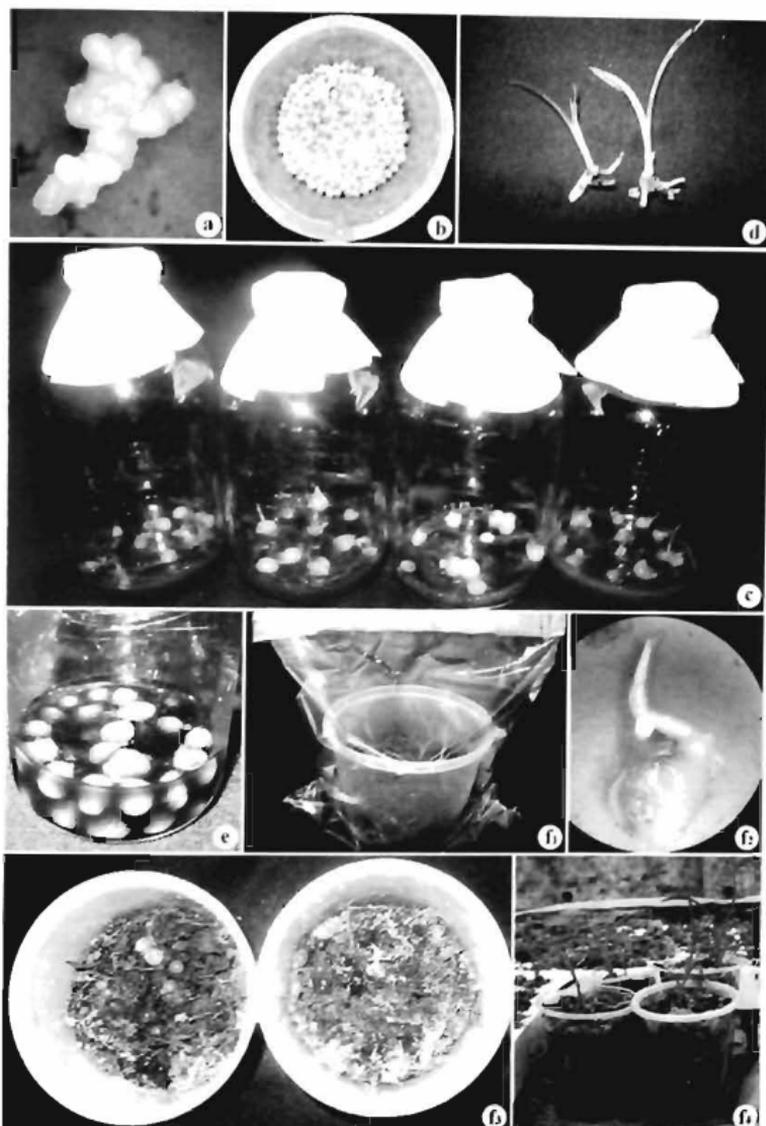
Khả năng bao quản của hạt nhân tạo có ý nghĩa quan trọng trong việc nhân giống và bảo tồn giống. Các hạt nhân tạo Địa lan được bao quản ở nhiệt độ phòng và các kết quả thu nhận sau 6 tháng bao quản được thể hiện qua bảng 5. Trong trường hợp hạt được bao quản trong các bình chứa 5 ml dung dịch bao quản thì tỷ lệ hạt sống sót là 53,7% do hạt có thể bị mất nước trong quá trình bao quản. Khi hạt được bao quản trong các bình chứa 20 ml dung dịch bao quản thì tỷ lệ hạt sống sót là 27,3%, thấp hơn so với hai thể tích 5 và 10 ml. Tỷ lệ hạt sống sót cao nhất là 80,3% khi bao quản ở thể tích dung dịch 10 ml. Lúc này, dung dịch bao quản có mực chất lỏng ngang bằng với chiều cao của lớp hạt dự trữ (Hình 1e). Từ đó, hạt không chi đủ nước để bao vệ lớp vỏ hydrogel mà còn đủ không khí để hô hấp và bảo tồn sự sống. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của Nhut (2005) trên đối tượng hạt nhân tạo từ PLB Địa lan. Phương pháp TZ được đánh giá là phương pháp đáng tin cậy và chính xác (Lakon, 1948; Patil,

Dadlani, 2009). Vì vậy, các hạt được bao quản trong thể tích 10 ml chất lỏng được lựa chọn trong nuôi cấy *in vitro*.

#### Ảnh hưởng của thời gian bao quản lên khả năng sinh trưởng của hạt nhân tạo Địa lan trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*

Bảng 6 thể hiện kết quả về ảnh hưởng của thời gian bao quản lên khả năng sinh trưởng của hạt nhân tạo Địa lan. Khi bao quản trong 1 tháng, tỷ lệ hạt sống sót đạt được cao nhất (100%) với tỷ lệ hình thành chồi và tỷ lệ ra rễ là 74,7% và 46%. Chiều cao chồi và chiều dài rễ cao nhất đạt được khi bao quản hạt nhân tạo Địa lan trong thời gian này (tương ứng lần lượt là 9,33 mm và 6,33 mm). Sau khi bao quản 6 tháng, hạt cũng có tỷ lệ sống sót là 79,33%, tỷ lệ hình thành chồi là 56,01% và tỷ lệ ra rễ là 11,88%.

Những kết quả trên cho thấy hạt nhân tạo Địa lan không bị mất nước khi bao quản trong điều kiện vô trùng, có khả năng bảo quản trong thời gian dài và được vận chuyển dễ dàng đến nơi nuôi trồng.



Hình 1. Hạt nhân tạo Địa lan "Xanh Chiếu" trong nhân giống và bảo quản: a: Phối sinh dưỡng Địa lan, b: Hạt nhân tạo Địa lan; c: Sinh trưởng của hạt nhân tạo Địa lan trong điều kiện nuôi cấy không đường với nút bông và nắp đậy giấy lọc, d: Sự thích nghi của cây con từ hạt nhân tạo trong nhà kính với những rễ mới, e: Bảo quản hạt nhân tạo Địa lan trong môi trường lỏng, f: Hạt nhân tạo Địa lan trong điều kiện ex vitro, g: Hệ thống túi nylon che phủ giúp cho việc nảy mầm của hạt nhân tạo Địa lan, h: Sự nảy mầm của hạt nhân tạo Địa lan; i<sub>1</sub>, i<sub>2</sub>: Sự sinh trưởng của hạt nhân tạo Địa lan.

**Bảng 5.** Ảnh hưởng của thể tích dung dịch bảo quản lên tỷ lệ sống sót của hạt nhân tạo Địa lan "Xanh Chiếu" sau 6 tháng bảo quản

Thể tích dung dịch bảo quản (ml)	Tỷ lệ hạt sống sót (%)
5	53,67b*
10	80,33a
20	27,33c

\*Các mẫu tự khác nhau (a, b, ...) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với  $P = 0,05$  bằng phép thử Duncan.

**Bảng 6.** Ảnh hưởng của thời gian bảo quản lên khả năng sinh trưởng của hạt nhân tạo Địa lan "Xanh Chiếu" sau 3 tháng nuôi cấy

Thời gian bảo quản	Tỷ lệ sống sót (%)	Tỷ lệ hình thành chồi (%)	Chiều cao chồi (mm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều dài rễ (mm)
1 tháng	100,00a*	74,67a**	9,33a	46,00a**	6,33a
3 tháng	92,67a	63,39b	4,33b	22,26b	3,33b
6 tháng	79,33b	56,01b	3,00b	11,88c	0,76c

\*Các mẫu tự khác nhau (a, b, ...) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với  $P = 0,05$  bằng phép thử Duncan.  
\*\*Số hạt hình thành chồi (hay rễ) trên tổng số hạt sống sót.

## KẾT LUẬN

Hạt nhân tạo Địa lan "Xanh Chiếu" với chất mầm là phôi sinh đường đã thể hiện ưu thế của phôi sinh đường với tỷ lệ sống sót, sinh trưởng cao cả trong điều kiện *in vitro* và *ex vitro*. Đây cũng là điều kiện cần thiết để sản xuất thành công hạt nhân tạo.

Phương pháp nuôi cấy *in vitro* trong điều kiện không bổ sung đường với việc sử dụng nút bông và nắp dày giấy lọc là hữu hiệu cho việc này mầm, sinh trưởng của hạt nhân tạo Địa lan với nồng độ sodium alginate 40 g/l. Cây con từ hạt có thể thích nghi tốt trong điều kiện tự nhiên.

Hạt nhân tạo Địa lan với lớp vỏ bọc không đường được xem là phù hợp với khả năng sống sót và thích nghi trong điều kiện nuôi trồng *ex vitro* với tỷ lệ tái sinh khá cao (35%).

Hạt nhân tạo Địa lan có thể bảo tồn khả năng sống sót khi được bảo quản (1 tháng, 3 tháng và 6 tháng) trong môi trường lỏng với mực chất lỏng ngang bằng với chiều cao của lớp hạt (10 ml thể tích chất lỏng/bình 100 ml với 40 hạt/bình).

Việc không sử dụng chất điều hòa sinh trưởng trong tất cả các thí nghiệm là một yếu tố thuận lợi để có thể tránh được các biến dị có thể xảy ra khi sử dụng các chất điều hòa sinh trưởng.

**Lời cảm ơn:** Các tác giả xin chân thành cảm ơn phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng (Viện Sinh học Tây Nguyên), Bộ môn Sinh lý Thực vật (Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh) đã hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arditti J (1992) *Fundamentals of orchid biology*. John Wiley and Sons, New York: 691.
- Bapat V (1991) Studies on synthetic seeds of sandalwood (*Santalum album* L.) and mulberry (*Morus indica* L.). In Redenbaugh K, ed. *Synseeds - Applications of synthetic seeds to crop improvement*. CRC Press Inc: 381-406.
- Corrie S, Tandon P (1993) Propagation of *Cymbidium giganteum* Wall through high frequency conversion of encapsulated protocorms under *in vivo* and *in vitro* conditions. *Ind J Exp Biol* 31: 61-64.
- Datta K, Kanullal B, De Sarker D (1999) Artificial seed technology: Development of a protocol in *Geodorum densiflorum* (Lam) Schltr - An endangered orchid. *Curr Sci online* 76(8): 1142-1144.
- Debojiti KM, Borthakur M, Borua PK (2010) Artificial seed production from encapsulated PLBs regenerated from leaf base of *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl. - an endangered orchid. *Curr Sci* 98(5): 686-690.

Harold JB (1998) Microbiological applications: laboratory manual in general microbiology. Boston, Mass., London, WCB/McGraw-Hill: 71-104.

Kamada H, Kiyosue T, Harada H (1988) New methods for somatic embryo induction and their use for synthetic seed production. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 24: 71.

Kurdmanec C, Kitaya Y, Kozai T (1995) Effects of CO<sub>2</sub> enrichment and supporting maternal *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*: anatomical comparisons. *Act Hort* 393: 111-118.

Kozai T, Oki H, Fujiwara K (1987) Effects of CO<sub>2</sub> enrichment and sucrose concentration under high photosynthetic photon fluxes on growth of tissue-cultured *Cymbidium* plantlets during the preparation stage. *Proc Symposium Florizel 87 Plant Micropropagation in Hort Indus Arlon, Belgium* 135-141.

Lakon G (1948) The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds. *Physiol Plant* 24: 389-394.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. *Physiol Plant* 15: 73-97

Nhut DT, Tien TNT, Huong MTN, Hien NTT, Huyen PX, Luan VQ, Teixeira da Silva J (2005) Artificial seeds for propagation and preservation of *Cymbidium* spp. *J Pro Orn Plants* 5(2): 67-73.

Patil VN, Dadlani M (2009) Tetrazolium test for seed viability and vigour. *Handbook of Seed Testing*

Redenbaugh K, Passch BD, Nichol JW, Kossler ME, Viss PR, Walker KA (1986) Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos. *Biol Tech* 4: 797-801.

Redenbaugh K, Fujii J, Slade D, Viss P, Kossler M (1991) Artificial seeds - encapsulated somatic embryos. In Bajaj YPS, ed. *High Technology and Micropropagation I. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer,

Heidelberg Berlin New York 17. 395-416.

Redenbaugh K (1993) Synthetic seeds of alfalfa; Carrot somatic embryogenesis and its application to synthetic seeds; Somatic embryogenesis and synthetic seed technology using carrot as a model system; Celery and lettuce; Somatic embryogenesis of Spruce. In Redenbaugh K, ed. *Synseeds - Applications of synthetic seeds to crop improvement*. CRC Press Inc: 231-255, 257-287, 289-304, 305-327, 427-450.

Saiprasad GVS, Polisetty R (2003) Propagation of three orchid genera using encapsulated protocorm-like bodies. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 39: 41-48.

Schenk RV, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50: 199-204.

Sharma A, Tandon P, Kumar A (1992) Regeneration of *Dendrobium wardianum* Warner (Orchidaceae) from synthetic seeds. *Ind J Exp Biol* 30: 747-748

Singh F (1991) Encapsulation of *Spathoglottis plicata* protocorms. *Lindleyana* 6: 61-64.

Teixeira JB, Giang DTT, Chan MT, Atsushi N, Chai ML, Julio C, Suprasanna P, Tanaka M (2007) 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 Biotech*: 15-23.

Trần Ngọc Thụy Tiên, Thái Khiết Vi, Trịnh Thị Hương, Trần Thị Ngọc Lan, Trần Trọng Tuấn, Đoàn Quốc Quỳnh, Vũ Quốc Luân, Nguyễn Thành Hải, Dương Tấn Nhựt (2010) Nghiên cứu một số điều kiện nảy mầm *in vitro* và *ex vitro* của hạt nhân tạo Địa lan (*Cymbidium* spp.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 8(3B): 1381-1388.

Zhan Y, Wang L, Chen S, Yang Y, He S (2009) Effect of microenvironment control on the photoautotrophic growth of plantlet in sugar-free tissue culture of *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit. *J Yunnan Agri*: 4-10

## STUDY ON CYMBIDIUM MADRIT "FOREST KING" SYNSEEDS IN PROPAGATION AND PRESERVATION

Tran Thi Ngoc Lan<sup>1</sup>, Hoang Van Cuong<sup>2</sup>, Hoang Xuan Chien<sup>2</sup>, Nguyen Ba Nam<sup>2</sup>, Nguyen Du Sanh<sup>1</sup>, Duong Tan Nhut<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>University of Natural Science, Ho Chi Minh City

<sup>2</sup>Tay Nguyen Institute of Biology, VAST

### SUMMARY

The application of synseeds in propagation and preservation of *Cymbidium* Madrit "Forest King" is reported in this paper. Synseeds were established by using two-month-old somatic embryos (SEs) covering

\* Author for correspondence: Tel: 84-63-3831056; Fax: 84-63-3831028; E-mail: [duongtanhut@gmail.com](mailto:duongtanhut@gmail.com)

with sodium alginate solution at different concentrations. Sodium alginate solution at 40 g/l was demonstrated as the most suitable concentration for production of these synseeds. These synseeds were grown and maintained in different culture systems. Among *in vitro* culture systems, ventilation culture without using sugar and plant growth regulator was the most effective system for culturing *Cymbidium* synseeds. *In vitro* germination and development of synseeds were obtained the highest rate at 88.3% after 3 month culture. Plantlet regenerated from synseeds in the ventilation condition survived at the highest rate (100%) after 1 month acclimatization in the greenhouse. These plantlets have induced new roots and grown vigorously. The synseeds preserved during 1, 3 or 6 months in sugar-free liquid medium have high survival rate (100, 92,7 or 79,3%, respectively). In addition, among two types of synseeds, those included sugar-free coat have better regeneration rate (35%) in *ex vitro* culture. The application of produced synseeds is a new approach in propagation and preservation of *Cymbidium*, a valuable orchid genus.

**Keywords:** *Cymbidium*, regeneration, sodium alginate, somatic embryo, sugar-free culture, synseed