

XÂY DỰNG QUY TRÌNH NHÂN NHANH GIỐNG ĐỊA LAN HỒNG HOÀNG (*Cymbidium iridioides*) BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO

**Establishment of the Protocol for Hong Hoang (*Cymbidium iridioides*)
Propagation by Tissue Culture Technique**

Hoàng Thị Nga, Nguyễn Quang Thạch, Đỗ Đức Thịnh, Hoàng Minh Tú

Viện Sinh học Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

TÓM TẮT

Nhân giống địa lan Hồng Hoàng - một giống địa lan quý bằng kỹ thuật nuôi cấy mô đang là nhu cầu bức xúc của thực tiễn sản xuất lan thương mại ở Việt Nam. Các công bố kết quả nghiên cứu về vấn đề này hầu như chưa có. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm thiết lập một quy trình nhân giống hiệu quả loài lan này. Các chồi non có kích thước từ 4 - 6 cm hoặc hạt được sử dụng làm mẫu cấy, môi trường tối ưu để khởi động mẫu chồi là: MS + 2% saccaro + 0,65% agar + 1,5 ppm BA, (hoặc 2 ppm Kinetin)/l, để gieo hạt: MS + 1% saccaro + 0,1% peptone + 0,1% than hoạt tính + 0,65% agar/l. Môi trường thích hợp để nuôi cấy lát mỏng đã xác định là: MS + 1 ppm K + 2% saccaro. Môi trường thích hợp nhất để nhân giống MS + 2% saccaro + 1,0 ppm Kinetin (hoặc 0,5 ppm BA) + 0,65% agar. Nghiên cứu đã xác định được môi trường tối thích để tạo cây hoàn chỉnh là MS + 0,1% than hoạt tính + 2,5% saccaro.

Từ khóa: Địa lan Hồng Hoàng, già hành, nuôi cấy lát mỏng, nhân nhanh *in vitro*, sự tái sinh.

SUMMARY

The propagation of the endangered species *Cymbidium iridioides* (Hong Hoang) by tissue culture is an urgent requirement in Viet Nam for commercial production. The aim of this study was to establish a successful protocol for *in vitro* propagation of that species. The experiment was arranged in a randomized complete block (RCB) with 3 replications. Using 4 - 6 cm young buds or seed as explants, the best media for initial establishment of the culture were MS + 2% saccharose + 0.65% agar + 1.5 ppm BA, (or 2 ppm Kinetin)/liter for apex regeneration and MS + 1% saccharose + 0.1% peptone + 0.1% active charcoal + 0.56% agar/liter for seed germination. The optimal medium for thin cell layer culture was MS + 1 ppm K + 2% saccharose. Media containing MS + 2% saccharose + 1.0 ppm Kinetin (or 0.5 ppm BA) + 0.65% agar and MS + 0.1% active charcoal + 2.5% saccharose were identified to be optimal for propagation and regeneration, respectively.

Key words: *In vitro* propagation, *Cymbidium*, regeneration, thin cell layer culture.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Một số giống lan quý như Hồng Hoàng (*Cymbidium iridioides*), Bạch Ngọc (*Cymbidium eburneum* Reichb) (Trần Hợp, 1998)... đang đứng trước nguy cơ cạn kiệt do nạn khai thác lan rừng bừa bãi của người dân. Để bảo tồn, phát triển nghề trồng hoa, cây cảnh của các địa phương miền núi phía Bắc, công nghệ nuôi cấy mô thực vật đưa vào ứng dụng trong sản xuất là một hướng phát triển đúng đắn.

Ngay từ năm 1963, phương pháp nhân giống địa lan (*Cymbidium*) bằng kỹ thuật nuôi cấy mô đã được đề xuất (Morel, 1963), sau này được phát triển thành công nghệ và được áp dụng rộng rãi. Từ đó đến nay, phương pháp này đã được sử dụng để nhân giống địa lan ở hầu hết các nước trên thế giới. Tuy nhiên, các nghiên cứu theo hướng này trên cây địa lan ở Việt Nam còn rất ít ỏi. Phạm Thị Liên (2000) khi công bố kết quả nghiên cứu đánh giá một số loài địa lan ở miền Bắc Việt Nam và bước đầu thử nghiệm nhân giống *in vitro* địa lan đã cho

rằng một số giống địa lan bản địa không nhân được bằng nuôi cấy mô. Nguyễn Quang Thạch, Hoàng Thị Nga (2004) cũng đã có những nghiên cứu bước đầu thành công trong việc nhân một số giống Địa lan quý ở Việt Nam nhưng chủ yếu là các giống thương mại. Vì vậy mục tiêu của nghiên cứu này nhằm thiết lập một qui trình nhân giống hiệu quả loài địa lan Hồng Hoàng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chồi, quả của cây địa lan Hồng Hoàng được thu thập từ Sa Pa. Chồi Hồng Hoàng có kích thước 4 - 6 cm, trên mỗi chồi này thường có 2 - 3 mắt ngủ và 1 chồi đỉnh. Chồi lấy về được rửa sạch bằng nước xà phòng loãng. Đưa vào buồng cấy vô trùng dùng dung dịch $HgCl_2$ 0,1% (1 gam/lít) khử trùng theo phương pháp khử trùng kép lần 1 là 7 phút, sau đó bóc lá bao bên ngoài tách các mắt ngủ riêng rẽ, khử trùng lại bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 1 phút sau đó rửa lại mẫu bằng nước cất vô trùng 4 - 5 lần rồi cấy mẫu vào môi trường.

Những cây địa lan bản địa thường là các giống thuần, vì vậy việc tạo quả để lấy hạt gieo là một trong những giải pháp khả hữu hiệu để nhân giống vì sự phân ly rất thấp. Khi quả bắt đầu chuyển từ màu xanh sang vàng nhạt, da hơi nhăn lại có

thể thu hái được. Dùng cồn 70^o lau sạch quả rồi ngâm trong dung dịch $HgCl_2$ 0,1% trong 10 phút rửa lại bằng nước vô trùng 3 lần sau đó bỏ quả gạt lấy hạt để cấy vào môi trường.

Trong thí nghiệm này, chúng tôi đã sử dụng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào. Đây là phương pháp được xem là tốt nhất hiện nay để tăng nhanh hiệu quả của quá trình nhân nhanh đặc biệt là quá trình tạo nguồn vật liệu khởi đầu. Chồi, thể sinh chồi (protocorm) được sử dụng làm nguyên liệu cắt lát mỏng. Kích thước các lát mỏng 0,3 - 0,5 mm.

Thí nghiệm được tiến hành tại Phòng thí nghiệm nuôi cấy mô, Viện Sinh học Nông nghiệp - Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội trong điều kiện nhân tạo với chế độ chiếu sáng 2500 - 3000 lux, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, nhiệt độ 23 - 25°C.

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu CRD, 3 lần lặp lại, mỗi công thức (CT) theo dõi 15 - 50 cá thể, theo dõi thường xuyên 10 - 15 ngày/lần đo đếm các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển của công thức thí nghiệm. Đánh giá thí nghiệm sau 8 - 14 tuần theo dõi. Số liệu được xử lý thống kê sinh học theo chương trình IRRISTAT 5.0.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN



Hình 1. Mẫu chồi và quả hoa lan Hồng Hoàng dùng trong nghiên cứu

3.1. Tạo nguồn vật liệu khởi đầu

3.1.1. Tạo nguồn vật liệu khởi đầu từ chồi

Chồi sau khi khử trùng đưa vào môi

trường nuôi cấy trên môi trường có bổ sung các chất điều tiết sinh trưởng (BA - benzyladenin, K - Kinetin) ở những nồng độ khác nhau (0 - 3 ppm).

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA đến quá trình phát sinh hình thái mẫu chồi cây Hồng Hoàng (sau 12 tuần nuôi cấy)

Công thức	Chỉ tiêu theo dõi	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Tỷ lệ tạo protocorm (%)	Protocorm, chồi tạo ra/mẫu cây
CT1: (Đ/C): MS + 2% đường + 0,65% agar		100,00	0,00	1,00
CT2: ĐC + 0,3 ppm BA		33,10	66,90	1,34
CT3: ĐC + 0,5 ppm BA		21,57	78,43	1,87
CT4: ĐC + 1,0 ppm BA		5,56	94,44	2,35
CT5: ĐC + 1,5 ppm BA		0,00	100,00	3,76
CT6: ĐC + 2,0 ppm BA		0,00	100,00	3,21
CT7: ĐC + 3,0 ppm BA		0,00	100,00	2,98

Bảng 2. Ảnh hưởng của Kinetin đến quá trình phát sinh hình thái mẫu chồi cây Hồng Hoàng (sau 12 tuần nuôi cấy)

Công thức	Chỉ tiêu theo dõi	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Tỷ lệ tạo protocorm (%)	Protocorm, chồi tạo ra/mẫu cây
CT1: (Đ/C): MS + 2% đường + 0,65% agar		100,00	0,00	1,00
CT2: ĐC + 0,3 ppm Kinetin		15,08	84,92	1,28
CT3: Đ/C+ 0,5 ppm Kinetin		13,10	86,90	1,65
CT4: ĐC + 1,0 ppm Kinetin		11,57	88,43	2,05
CT5: ĐC + 1,5 ppm Kinetin		3,00	97,00	2,48
CT6: ĐC + 2,0 ppm Kinetin		0,00	100,00	3,01
CT7: ĐC + 3,0 ppm Kinetin		0,00	100,00	2,83

Protocorm :Thế sinh chồi

Kết quả bảng 1 và 2 cho thấy: các chất điều tiết sinh trưởng BA và Kinetin có tác dụng kích thích sự phát sinh hình thái của mẫu cấy theo hướng tạo các thể sinh chồi (protocorm) đây chính là nguồn nguyên liệu phục vụ cho quá trình nhân nhanh tiếp theo. Trong khi đó, trên môi trường không có bổ sung BA hay K, mẫu cấy ban đầu chỉ hình thành 1 chồi duy nhất. Nồng độ BA hay K càng cao thì càng tăng tỷ lệ tạo protocorm (từ 66,9 - 100%). Các công thức có bổ sung BA nồng

độ 1,5 ppm và Kinetin ở nồng độ 2 ppm trở lên, tỷ lệ phát sinh hình thái đều đạt 100% theo hướng tạo protocorm. Đồng thời số protocorm, chồi tạo ra/mẫu cấy đều đạt cao nhất ở môi trường có bổ sung BA là 3,76 và Kinetin là 3,01. Vì thế có thể sử dụng môi trường MS + 2% đường + 0,65% agar + 1,5 ppm BA (hoặc 2 ppm Kinetin) để tạo nguồn vật liệu nuôi cấy mẫu Hồng Hoàng từ chồi.

3.1.2. Tạo nguồn vật liệu khởi đầu từ hạt

Bảng 3. Ảnh hưởng của nền môi trường gieo hạt khác nhau đến tỷ lệ nảy mầm và chất lượng chồi từ hạt cây Hồng Hoàng (sau 6 tuần theo dõi)

Công thức	Chỉ tiêu theo dõi	Sự biến đổi màu sắc, hình thái						Tỷ lệ nảy mầm	Chất lượng
		1 tuần	2 tuần	3 tuần	4 tuần	5 tuần	6 tuần		
CT1: MS + 1% đường + 0,1% peptone + 0,2% THT + 0,65% agar		-	-	+	++	++	+++	****	Tốt
CT2: Knop + 1% đường + 0,1% peptone + 0,2% THT + 0,65% agar		-	-	-	+	++	+++	*	Tốt
CT3: V&W + 1% đường + 0,1% peptone + 0,2% THT + 0,65% agar		-	-	+	++	++	+++	***	Tốt
CT4: Hyponex + 1% đường + 0,1% peptone + 0,2% THT + 0,65% agar		-	-	-	+	++	+++	***	Tốt

Ghi chú: - : Không có màu xanh

+ : Hơi xanh

++ : Xanh nhạt, tròn đều

+++ : Xanh đậm, tròn đều, bóng

++++ : Hình thành chồi

* : Từ 0 – 25%

** : Từ 25 – 50%

*** : Từ 50 – 75%

**** : Từ 75 – 100%

Trên các nền môi trường nuôi cấy khác nhau thì tỷ lệ nảy mầm của hạt cũng rất khác nhau (Bảng 3).

Trên nền môi trường Knop là môi trường nghèo dinh dưỡng hơn cả thì tỷ lệ nảy mầm của hạt rất kém (chỉ đạt 10 - 15%) chồi cũng như thể protocorm hình thành có chất lượng rất kém. Các nền môi trường Hyponex và "Vacin and Went" có tỷ lệ nảy mầm của hạt chỉ đạt 60 - 70% và chất lượng của mẫu tương đối tốt tuy nhiên tỷ lệ mẫu hình thành chồi thấp hơn so với protocorm. Đây là đặc điểm rất khác. So với hạt phong lan trên 2 nền môi trường này, tỷ lệ nảy mầm của hạt phong lan đạt 100% chỉ sau 2,5 - 3 tuần nuôi cấy. Ở môi trường MS hạt phát triển tương đối đều nhau và sớm hơn với các môi trường khác. Tỷ lệ hạt nảy mầm đạt cao nhất (80 - 90%) và đồng thời chất lượng mẫu cũng tốt

nhất. Tỷ lệ hình thành chồi 70 - 80%. Các chồi hình thành rất đều nhau và có màu xanh đậm. Vậy môi trường thích hợp để gieo hạt cho địa lan Hồng Hoàng là MS + 1% đường + 0,1% peptone + 0,2% than hoạt tính + 0,65% agar.

3.2. Các thí nghiệm nuôi cấy lát mỏng tế bào

Trong nhân giống *in vitro*, việc sử dụng các chồi đỉnh hay chồi nách là nguồn mẫu tốt nhất làm nguyên liệu đưa vào nuôi cấy. Tuy nhiên hầu hết các giống địa lan bản địa tốc độ đẻ chồi rất kém vì vậy mà nguồn mẫu có thể lấy được rất ít. Hơn nữa khi sử dụng chồi đỉnh hay chồi nách làm nguồn vật liệu đưa vào nuôi cấy *in vitro* thì cần phải có thời gian rất dài (3 - 4 tháng). Do đó nếu có thể rút ngắn được giai đoạn này thì sẽ rất có ý nghĩa.

Bảng 4. Ảnh hưởng của BA đến sự phát sinh hình thái lát cắt protocorm của cây lan Hồng Hoàng (sau 6 tuần nuôi cấy)

Công thức	Chỉ tiêu theo dõi	Protocorm, chồi tạo ra/mẫu cấy	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Tỷ lệ tạo protocorm (%)	Tỷ lệ phát sinh hình thái (%)
CT1(ĐC): MS + 2% đường + 0,65% agar		2,20	38,44	61,56	55,17
CT2: ĐC+ 0,3 ppm BA		5,00	20,11	79,89	91,12
CT3: ĐC+ 0,5 ppm BA		5,84	12,10	87,90	97,77
CT4: ĐC+ 1,0 ppm BA		5,23	10,28	89,72	100,00
CT5: ĐC+ 1,5 ppm BA		4,11	9,44	90,56	100,00
CT6: ĐC+ 2,0 ppm BA		3,44	7,39	92,61	100,00
CT7: ĐC+ 3,0 ppm BA		2,93	3,50	96,50	100,00
LSD (5%)		0,11			
CV (%)		3,50			

Bảng 5. Ảnh hưởng của Kinetin đến sự phát sinh hình thái lát cắt protocorm của cây Hồng Hoàng (sau 6 tuần nuôi cấy)

Công thức	Chỉ tiêu theo dõi	Protocorm, chồi tạo ra/mẫu cấy	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Tỷ lệ tạo protocorm (%)	Tỷ lệ phát sinh hình thái (%)
CT1 (ĐC): MS + 2% đường + 0,65% agar		2,20	38,44	61,56	55,17
CT2: ĐC + 0,3 ppm Kinetin		4,11	15,14	84,86	84,44
CT3: ĐC + 0,5 ppm Kinetin		4,71	12,26	87,74	95,66
CT4: ĐC + 1,0 ppm Kinetin		5,82	8,38	91,62	100,00
CT5: ĐC + 1,5 ppm Kinetin		4,33	5,76	94,24	100,00
CT6: ĐC + 2,0 ppm Kinetin		4,16	3,95	96,05	100,00
CT7: ĐC + 3,0 ppm Kinetin		3,19	1,85	98,15	100,00
LSD (5%)		0,82			
CV (%)		3,20			

Phát sinh hình thái là sự hình thành chồi hay thể sinh chồi. Việc sử dụng kỹ thuật cắt lát mỏng làm tăng đáng kể số protocorm, chồi tạo ra/mẫu cấy (Bảng 4 và Bảng 5). Mỗi chồi có thể cắt được nhiều lát mỏng càng làm tăng lượng chồi và protocorm tạo ra từ mỗi mẫu cấy. Ngay trên môi trường không có bổ sung BA hay K thì trên mỗi lát mỏng trung bình đã hình thành 2,2 chồi hay thể chồi (Bảng 5).

Tuy nhiên chỉ có 55,17% số lát mỏng có sự hình phát sinh hình thái. Khi bổ sung BA hay K vào môi trường nuôi cấy đã kích thích sự phát sinh hình thái của lát mỏng rất mạnh mẽ (79,89 - 100%).

Trong phạm vi nồng độ BA từ 0 - 0,5 ppm và K từ 0 - 1 ppm, khi tăng nồng độ lên thì sự hình thành chồi, protocorm/lát mỏng cũng tăng lên (2,2 - 5,84) nhưng khi nồng độ cao hơn thì cùng với sự tăng nồng độ ((0,5 ppm (1 ppm) - 3ppm)) bổ sung vào môi trường thì lại làm giảm sự hình thành số chồi, protocorm/lát mỏng (5,84 - 2,93). Với nồng độ cao, các protocorm thu được có hình dạng sần sùi, xốp, màu vàng nhạt. Đây là những protocorm kém chất lượng rất khó phát triển hình cây.

Số protocorm, chồi tạo ra/mẫu cấy của các mẫu nuôi cấy của lát mỏng Hồng Hoàng đạt được lớn nhất 5,84 ở nồng độ 0,5 ppm BA tuy nhiên khi bổ sung Kinetin vào môi trường nuôi cấy lát mỏng thu được protocorm có màu xanh bóng, khoẻ mạnh và số protocorm, chồi tạo ra/mẫu cấy khi bổ sung 1,0ppm Kinetin vào môi trường nuôi cấy cũng rất lớn (5,82 lần) do đó ta có thể sử dụng môi trường sau để nuôi cấy lát mỏng đối với mẫu địa lan Hồng Hoàng: MS + 2% đường + 0,65% agar + 1,0 ppm Kinetin (hoặc 0,5 ppm BA).

Từ 1 mẫu chồi ban đầu với phương pháp LMTB sau 11 - 12 tuần nuôi cấy (4 - 5 tuần trên môi trường nuôi cấy khởi động, 7 - 8 tuần trên môi trường nuôi cấy lát mỏng) sẽ thu được 5 lát/chồi *70% (tỷ lệ của lát mỏng phát sinh hình thái) *5,82 (5,84) = 20,37 - 20,30 chồi, protocorm. Như vậy bằng phương pháp nuôi cấy lát mỏng thì ta có thể tạo vật liệu khởi đầu lượng mẫu cao gấp 4 - 5 lần so với phương pháp thông thường (đạt 3,7 - 4 chồi, protocorm/mẫu chồi).



Hình 2. Protocorm và chồi giống lan Hồng Hoàng



Hình 3. Cây con lan Hồng Hoàng nuôi cấy mô

3.3. Giai đoạn nhân nhanh

Mục tiêu nghiên cứu ở giai đoạn này là tìm ra môi trường tốt nhất để có được nhiều chồi, protocorm nhất trong thời gian

ngắn nhất. Môi trường nuôi cấy được bổ sung vào các hợp chất cytokinin với nồng độ khác nhau để kích thích sự nhân nhanh của chồi, protocorm.

Bảng 6. Ảnh hưởng của BA đến hệ số nhân và chất lượng protocorm của cây Hồng Hoàng (sau 6 tuần nuôi cấy)

Công thức	Chỉ tiêu theo dõi	Hệ số nhân (lần)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Tỷ lệ tạo protocorm (%)	Chất lượng
CT1(ĐC): MS + 2% đường + 0,65% agar + 15% ND		1,65	78,76	21,24	TB
CT2: ĐC+ 0,3 ppm BA		1,78	53,43	46,57	TB
CT3: ĐC+ 0,5 ppm BA		1,90	38,80	61,20	Tốt
CT4: ĐC+ 0,7 ppm BA		2,62	10,12	89,88	Rất tốt
CT5: ĐC+ 1,0 ppm BA		2,49	6,52	93,48	Tốt
CT6: ĐC+ 1,5 ppm BA		2,04	0	100	Tốt
CT7: ĐC+ 2,0 ppm BA		1,80	0	100	Tốt
CT8: ĐC+ 3,0 ppm BA		1,33	0	100	TB
LSD (5%)		0,11			
CV (%)		3,2			

Bảng 7. Ảnh hưởng của Kinetin đến hệ số nhân và chất lượng protocorm của cây Hồng Hoàng (sau 6 tuần nuôi cấy)

Công thức	Chỉ tiêu theo dõi	Hệ số nhân (lần)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Tỷ lệ tạo protocorm (%)	Chất lượng
CT1(ĐC): MS + 2% đường + 0,65% agar + 15% ND		1,65	78,76	21,24	TB
CT2: ĐC+ 0,3 ppm Ki		1,74	65,72	34,28	TB
CT3: ĐC+ 0,5 ppm Ki		2,09	56,04	43,96	Tốt
CT4: ĐC+ 0,7 ppm Ki		2,62	41,95	58,05	Rất tốt
CT5: ĐC+ 1,0 ppm Ki		2,76	36,93	63,07	Rất tốt
CT6: ĐC+ 1,5 ppm Ki		2,04	28,51	71,49	Rất tốt
CT7: ĐC+ 2,0 ppm Ki		1,80	16,86	83,14	Tốt
CT8: ĐC+ 3,0 ppm Ki		1,49	12,17	97,83	Tốt
LSD (5%)		0,19			
CV (%)		4,6			

Khi bổ sung BA hay K vào môi trường nuôi cấy đã làm tăng hệ số nhân so với đối chứng (Bảng 7). Khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy nồng độ BA từ 0 - 0,7 ppm thì hệ số nhân tăng (từ 1,65 - 2,62). Nhưng khi tiếp tục tăng nồng độ BA cao hơn nữa (3ppm) thì hệ số nhân lại giảm, đồng thời tỷ lệ chồi cũng như chất lượng chồi cũng giảm.

Tác động của Kinetin đến quá trình nhân nhanh cũng tuân theo qui luật tương

tự và môi trường nuôi cấy với nồng độ Kinetin 1ppm cho hệ số nhân cao nhất là 2,76. Tỷ lệ chồi, protocorm (36,93 chồi, 63,07 protocorm) là rất cân đối và có chất lượng cao hơn hẳn so với BA trong quá trình nhân nhanh mẫu và môi trường thích hợp cho quá trình nhân nhanh là: MS + 2% đường + 0,65% agar + 1ppm Kinetin + 15% nước dừa.

3.4. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Bảng 8. Ảnh hưởng của α -NAA đến sự hình thành rễ của cây địa lan Hồng Hoàng (sau 30 ngày nuôi cấy)

Công thức	Chỉ tiêu theo dõi	Tỷ lệ ra rễ (%)					Số rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)	Chiều cao cây (cm)
		Sau 10 ngày	Sau 15 ngày	Sau 20 ngày	Sau 25 ngày	Sau 30 ngày			
CT ₁ (Đ/C): MS + 2% đường + 15% ND + 0,65% agar		0	0	4,44	55,56	100	1,33	1,62	7,03
CT ₂ : ĐC + 0,1 ppm α -NAA		0	0	35,56	77,78	100	1,42	1,67	8,15
CT ₃ : ĐC + 0,2 ppm α -NAA		0	8,89	51,11	86,67	100	1,47	1,73	7,68
CT ₄ : ĐC + 0,3 ppm α -NAA		6,67	13,56	63,73	100	100	1,76	1,97	7,18
LSD (5%)							0,16		
CV (%)							4,7		

Bảng 9. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến sự hình thành rễ của cây địa lan Hồng Hoàng (sau 30 ngày nuôi cấy)

Công thức	Chỉ tiêu theo dõi	Tỷ lệ ra rễ (%)					Số rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)	Chiều cao cây (cm)
		Sau 10 ngày	Sau 15 ngày	Sau 20 ngày	Sau 25 ngày	Sau 30 ngày			
CT1: (Đ/C): MS + 2% đường + 15% ND + 0,65% agar		0	0	4,44	55,56	100	1,31	1,62	7,03
CT2: ĐC + 0,025% THT		0	15,56	57,78	86,67	100	2,18	2,46	7,17
CT3: ĐC + 0,05% THT		0	24,44	75,56	100	100	2,33	2,50	7,60
CT4: ĐC + 0,1% THT		17,78	51,11	100	100	100	2,53	2,98	7,72
LSD (5%)							0,17		
CV (%)							4,4		

Các chồi được hình thành ở giai đoạn nhân nhanh trước khi ra vườn ươm cần phải có bộ rễ khỏe mới có khả năng sống sót cao cũng như sinh trưởng phát triển mạnh. Cây địa lan Hồng Hoàng có thể ra rễ ngay trên môi trường không cần bổ sung chất điều tiết sinh trưởng (Bảng 8 và Bảng 9). Tuy nhiên quá trình ra rễ kéo dài hơn rất nhiều (30 ngày sau cấy) so với việc có bổ sung vào môi trường nuôi cấy nồng

độ rất thấp (0,3 ppm) α -NAA hay 1 gam than hoạt tính thì sau 25 ngày tỷ lệ ra rễ đó đạt 100%. Công thức bổ sung 1g/l than hoạt tính vào trong môi trường nuôi cấy thử sau 20 ngày 100% số chồi đã ra rễ và số rễ/cây cũng cao nhất (2,53 rễ).

Như vậy môi trường ra rễ tối ưu cho cây địa lan Hồng Hoàng là: MS + 2% đường + 0,1% than hoạt tính + 0,65% agar + 15% nước dừa.

4. KẾT LUẬN

Chồi bên có kích thước 4 - 6 cm hoặc hạt là nguồn vật liệu khởi đầu cho quá trình nhân giống vô tính.

Môi trường khởi động cho mẫu nuôi cấy là môi trường MS + 2% đường + 0,65% agar + 1,5 ppm BA (2 ppm Kinetin).

Phương pháp nuôi cấy lát cắt mỏng với kích thước 0,3 - 0,5 mm đối với các thể chồi có thể được áp dụng để tăng hệ số nhân. Môi trường thích hợp để nuôi cấy lát mỏng là: MS + 2% đường + 0,65% agar + 1,0 ppm Kinetin (hoặc 0,5 ppm BA).

Việc bổ sung Cytokinin(BA, Kinetin) có tác dụng thúc đẩy quá trình nhân nhanh các thể protocorm. Môi trường tối ưu để nhân nhanh giống địa lan Hồng Hoàng là: MS + 2% đường + 0,65% agar + 1 ppm Kinetin + 15% nước dừa.

Môi trường ra rễ tạo cây hoàn chỉnh thích hợp là: MS +2% đường + 0.2% Than hoạt tính + 0,65% agar +15%nước dừa.

5. TÀI LIỆU THAM KHẢO

Morel, G (1963). "*Producing virus - free Cymbidium*" Amer Orchid Soc, Bull, vol 29; p.495 - 497.

Phạm Thị Liên (2000). *Nghiên cứu đánh giá một số loài địa lan ở miền Bắc Việt Nam*. Luận án tiến sỹ Nông nghiệp.

Trần Hợp (1998). *Phong lan Việt Nam*. NXB Nông nghiệp. 1998, tr.203.

Nguyễn Quang Thạch, Hoàng Thị Nga, Vũ Thị Hoài, Nguyễn Thị Lý Anh (2004). *Nghiên cứu nhân nhanh in vitro giống Địa lan thương mại Miss Kim*; Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 11/2004, pp. 1505 - 1505.



Hình 4. Hoa lan Hồng Hoàng

