

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH NHÂN NHANH *IN VITRO* SÁU DÒNG HOA LAN HUỆ - *Hippeastrum esquestre* (Aiton) Herb

Phạm Đức Trọng¹, Nguyễn Hạnh Hoa¹, Phí Thị Cẩm Miện^{2*}

¹*Khoa Nông học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội*

²*Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội*

Email*: mienbmtvat@gmail.com

Ngày gửi bài: 19.03.2014

Ngày chấp nhận: 29.05.2014

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm mục đích xây dựng quy trình nhân nhanh *in vitro* sáu dòng hoa Lan Huệ lai (*Hippeastrum esquestre*). Kết quả đã xác định được môi trường khởi động thích hợp nhất đối với vật liệu vào mẫu là vảy củ đôi của 6 dòng lai (H1, H3, H5, H37, H85, H12) như sau: MS + 2-3 mg/l BA + 1,0 mg/l kinetin + 0,25 mg/l αNAA. Hệ số nhân đạt 2,79-3,75 chồi/mẫu. Môi trường tối ưu khi sử dụng vật liệu là củ nhỏ *in vitro* được bỏ ra làm 4 phần, mỗi phần đều dính một phần để củ là: MS + 3-5 mg/l BA + 1,0 mg/l kinetin + 0,25 mg/l αNAA, hệ số nhân chồi đạt 4,23-5,65 chồi/mẫu. Môi trường tạo rễ cho chồi là: MS + 1,5-2,0 mg/l αNAA. Trên môi trường này chồi ra rễ 100% chỉ sau 2 tuần. Giá thể thích hợp để ra cây là cát: trấu hun với tỷ lệ 3:1, trên giá thể này cây sống 100% và sinh trưởng tốt.

Từ khoá: BA, IBA, α-NAA, Lan Huệ lai, nhân giống *in vitro*.

Study on *in Vitro* Micropropagation of Six hybrids *Hippeastrum esquestre* (Aiton) Herb.

ABSTRACT

This study was conducted to establish a preliminary protocol for *in vitro* rapid propagation of six Hybrids of *H. esquestre*. Results showed that the optimal medium for shoot initiation from bulb scales of six hybrids (H1, H3, H5, H37, H85, H12) was MS + 2-3 mg/l IBA + 1.0 mg/l kinetin + 0,25 mg/l αNAA. Shoot propagation was 2.79-3.75 shoots/explant. Small shoot and bulds were divided in to four parts and cultured in to MS + 3-5 mg/l BA + 1.0 mg/l kinetin + 0,25 mg/l αNAA. Shoot propagation was 4.23-5.65 shoots/explant. Rooting medium consisting of MS + 1.5-2.0 mg/l NAA induced shoots with 100% root formation. Well-rooted plantlets were successfully transplanted to sand and rice husk substrate (3:1). The rate of plants survival was 100% and plants grew and developed well.

Keywords: BA, α-NAA, *Hippeastrum esquestre* (Aiton), *In vitro* micropropagation.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan Huệ (*Hippeastrum esquestre* (Aiton) Herb.), tên tiếng Anh là Valentine flower. Nếu như ở các nước Châu Âu, loài hoa này được sử dụng phổ biến làm quà tặng nhân dịp “Valentine” với nhiều giống hoa có màu sắc đa dạng thì ở Việt Nam, Lan Huệ còn rất nghèo nàn về màu sắc (chủ yếu là màu đỏ), thời gian ra hoa của chúng lại muộn hơn (khoảng từ giữa tháng 3 đến cuối tháng 5. Như vậy để phát triển

Lan Huệ ở Việt Nam cần tiến hành nghiên cứu tăng độ đa dạng về màu sắc hoa và chọn tạo giống có thời gian ra hoa phù hợp với dịp có nhu cầu tiêu thụ lớn của thị trường.

Để nhân giống vô tính cây Lan Huệ có thể sử dụng các phương pháp: Tách củ nhỏ từ cụm cây mẹ (Siddique et al., 2007); kỹ thuật cắt lát ((Epharath et al. (2001) hoặc sử dụng phương pháp nhân giống *in vitro* (Husey, 1975; Seabrook et al., 1976; De Buruyn, 1992; Huang et al., 2005).

So với phương pháp nhân giống *in vitro*, các phương pháp nhân giống khác tuy đơn giản nhưng ít hiệu quả do thời gian nhân giống dài, hệ số nhân thấp. Trong khi đó, phương pháp nhân giống *in vitro* có rất nhiều ưu điểm như tạo được cây con sạch bệnh, thời gian nhân giống ngắn, hệ số nhân giống cao, cây đồng nhất, đáp ứng được nhu cầu cả về số lượng và chất lượng giống. Bên cạnh đó, nhân giống *in vitro* các dòng lan Huệ lai còn phục vụ cho các công tác nghiên cứu chọn tạo giống mới bằng kỹ thuật gây đột biến, chuyển gen. Năm 2010, Nguyễn Thị Phương Thảo và cs. đã bước đầu xây dựng quy trình nhân nhanh hai dòng hoa Lan Huệ Mạng và Loa kèn Đỏ nhưng. Ngoài ra, nhân nhanh bằng phương pháp cắt lát củ đã được rất nhiều nhóm tác giả nghiên cứu cả trong điều kiện *in vivo* và *in vitro*. Epharath et al. (2001) đã sử dụng 7 phương pháp cắt củ, chia củ mẹ thành 2, 4, 8, 12, 16, 32 và 48 lát cắt, mỗi lát cắt đều mang 1 phần đế củ và giâm vào túi nilon có chứa chất khoáng bón cho cây. Các túi này được đặt trong điều kiện nhiệt độ 23°C trong 4 tháng. Kết quả cho thấy, khi cắt củ thành 48 phần thì số lượng chồi thu được là cao nhất, 34 chồi/mẫu. Năm 1991, O'Rourke et al., cắt củ nhỏ *in vitro* tạo ra từ vảy củ đôi trên môi trường tạo củ của loài *Hippeastrum hybridum* "Apple Blossom" thành 2 hoặc 4 phần và tiếp tục nuôi cấy trong 10-12 tuần. Sau 26-28 tuần nuôi cấy, hệ số nhân thu được đã tăng lên 100 chồi/mẫu ban đầu. Bằng phương pháp cắt củ này, Slabbert et al. (1993) cũng đã thu được 700-1.000 cây từ 1 củ ban đầu sau 12 tháng.

Trong khuôn khổ đề tài nghiên cứu chọn tạo giống hoa Lan Huệ. Tác giả Nguyễn Hạnh Hoa và cs. (2009, 2010) đã chọn tạo ra hàng loạt con lai có màu sắc đa dạng, phong phú, đẹp mắt, độ bền hoa cao và có thời gian ra hoa đúng vào dịp Valentine. Điển hình là các dòng H1, H3, H5, H12, H37, H85. Các dòng lai trên có nhiều ưu điểm như có màu sắc hoa đẹp và khác biệt so với bố mẹ, hoa có độ bền lâu. Tuy nhiên có nhược điểm là sinh sản vô tính kém (trong điều kiện tự nhiên), đặc biệt là các dòng lai H1, H85 và H37. Để đánh giá và duy trì nguồn vật liệu quý trên, việc nghiên cứu nhân nhanh vô tính các dòng Lan Huệ trên là rất cần thiết.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Đối tượng, vật liệu nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: 6 dòng lan Huệ lai H1, H3, H5, H12, H37, H85 (*Hippeastrum esquestre*). Các dòng lai là kết quả của phép lai hữu tính giữa các dòng bố mẹ sau:

Vật liệu sử dụng cho thí nghiệm là vảy củ đôi (gồm 2 vảy có kích thước 10 x 10mm) có dính phần đế củ và củ nhỏ *in vitro* (cây Lan Huệ lai con phát sinh trong điều kiện nuôi cấy mô phát sinh chồi gắn liền với củ nhỏ *in vitro*).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp nuôi cấy mô hiện hành. Mẫu được khử trùng theo quy trình: Củ Lan Huệ lai được thu và để héo trong 2 ngày sau đó làm sạch bề mặt dưới vòi nước chảy mạnh, ngâm trong xà phòng 10 phút, sau đó rửa sạch. Tiến hành khử trùng mẫu trong buồng cấy vô trùng, ngâm củ trong cồn 70°C trong 30 giây, tráng lại bằng nước cất vô trùng 1-2 lần, mỗi lần trong 1 phút. Tiếp theo ngâm củ trong dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 12 phút, rửa lại 4-5 lần bằng nước cất vô trùng, mỗi lần 1 phút. Sau đó cắt phần đế củ mang 2 vảy củ (10 x 10mm) và cấy vào môi trường nuôi cấy cơ bản MS bổ sung 30 g/l saccarose, 5,5 g/l agar và các chất điều tiết sinh trưởng, pH môi trường được chỉnh về 5,7 trước khi được hấp vô trùng ở 121°C; 1,1 atm trong 20 phút. Mẫu cấy được đặt trong buồng nuôi có nhiệt độ 25°C ± 2, cường độ ánh sáng 2.000 lux, thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày. Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần, mỗi lần 7 bình, mỗi bình 3 mẫu. Các chỉ tiêu theo dõi định kỳ 1 tuần/lần. Các chỉ tiêu nghiên cứu bao gồm tỷ lệ mẫu tạo chồi (%), chiều cao chồi (cm), hệ số nhân chồi (số chồi/mẫu), trạng thái chồi, tỷ lệ ra rễ (%), số rễ/chồi, chiều dài rễ (cm), tỷ lệ cây sống (%). Các số liệu được phân tích thống kê bằng phần mềm Excel, so sánh các giá trị trung bình bằng phương pháp kiểm định Duncan và LSD ở mức ý nghĩa 5%

Ký hiệu
dòng Lan Huệ lai

Nguồn gốc tổ hợp lai

Màu sắc

H1

♂ĐN x ♀Tr



H3

♂ĐST x ♀ĐN



H5

♂Tr x ♀ĐST



H12

♂Tr x ♀ĐST



H37

♂ĐST x ♀ĐN



H85

♂DST x ♀ĐN



3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu sự phát sinh hình thái của vảy củ đôi trên nền môi trường có bổ sung auxin và cytokinin

3.1.1. Ảnh hưởng của cytokinin tới sự phát sinh hình thái của vảy củ đôi hoa Lan Huệ lai

a/Ảnh hưởng của BA đến khả năng phát sinh hình thái của mẫu nuôi cấy

Sau 2 tuần nuôi cấy, các mẫu sạch bệnh sẽ được chuyển sang môi trường có bổ sung BA với các nồng độ khác nhau. Kết quả nghiên cứu sau 4 tuần (Bảng 1) cho thấy hầu hết các dòng Lan Huệ lai đều có khả năng tái sinh chồi ngay trong điều kiện dinh dưỡng không có chất điều tiết sinh trưởng, tuy nhiên tỷ lệ chồi tái sinh còn rất thấp. Nồng độ BA từ 2,0 đến 3,0 mg/l là nồng độ thích hợp cho đa số các dòng lai. Ở nồng độ 2,0 mg/l BA các dòng lai H1, H12, H37 cho số chồi đạt cao nhất lần lượt là 1,92, 1,79 và 2,09

chồi/mẫu. Trong khi dòng lai H3, H5, H85 lại thích hợp với nồng độ 3,0 mg/l BA cho số chồi đạt cao nhất lần lượt là: 2,11, 3,05 và 1,82 chồi/mẫu.

b/Ảnh hưởng của BA và Kinetin đến khả năng phát sinh hình thái của mẫu nuôi cấy

Nhiều nghiên cứu nuôi cấy *in vitro* cho thấy BA là loại phytohormon có tác dụng tăng nhanh hệ số nhân chồi và kinetin cũng có tác dụng tương tự nhưng thường cho chất lượng chồi tốt hơn so với BA (Nguyễn Quang Thạch và cs., 2004).

Do đó để cải thiện chất lượng chồi nhân cũng như hệ số nhân chồi chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của sự phối hợp hai loại cytokinin này với nhau. Bảng 2 trình bày kết quả nghiên cứu ảnh hưởng phối hợp của BA (sử dụng nồng độ tối ưu cho từng dòng từ kết quả bảng 1) và kinetin (0,5-2,0 mg/l) tới khả năng tái sinh chồi từ vảy củ đôi.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA đến khả năng tái sinh chồi từ vảy củ đôi

BA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)						Số chồi/mẫu (chồi)					
	H1	H3	H5	H12	H37	H85	H1	H3	H5	H12	H37	H85
0	11,1	10,9	12,4	9,21	7,62	6,51	0,12	0,18	0,21	0,23	0,15	0,11
1,0	46,1	48,8	53,2	33,6	37,4	23,2	1,21	1,34	1,67	1,56	1,46	1,32
2,0	76,2	67,3	86,6	83,1	89,5	43,7	1,92	1,77	2,32	1,79	2,09	1,67
3,0	84,3	86,2	97,8	78,3	79,6	61,3	1,86	2,11	3,05	1,65	1,91	1,82
4,0	79,4	77,6	88,1	75,5	73,2	56,9	1,55	1,71	2,43	1,55	1,88	1,67
LSD 5%							0,18	0,22	0,08	0,33	0,21	0,12
CV (%)							4,6	5,4	6,7	4,5	5,1	7,3

Ghi chú: Môi trường nền: MS + 30 g/l saccarose + 6,5 g/l agar.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BA và Kinetin đến khả năng tái sinh chồi từ vảy củ đôi

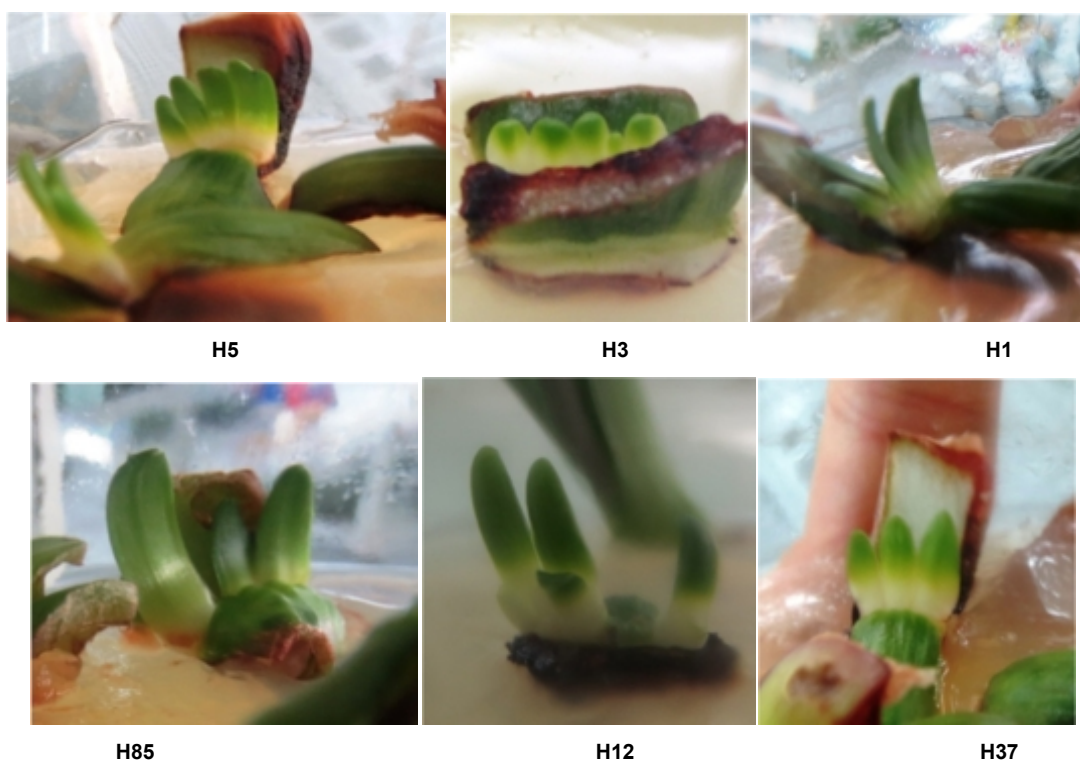
Kinetin (mg/l)	Hệ số nhân chồi (lần)						Đặc điểm chồi					
	H1	H3	H5	H12	H37	H85	H1	H3	H5	H12	H37	H85
0,5	1,97	2,23	3,09	2,41	2,22	1,88	++	++	++	++	++	++
1,0	2,34	2,55	3,32	2,06	2,49	2,29	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1,5	2,21	2,12	2,76	1,87	2,06	1,76	++	++	++	++	++	++
2,0	2,09	1,98	1,99	1,78	1,45	1,59	+	+	+	+	+	+
LSD 5%	0,33	0,28	0,12	0,25	0,12	0,19	+: Chồi kém, lá màu xanh nhạt					
CV (%)	5,2	3,7	4,3	3,8	4,2	5,6	++: Chồi đẹp, lá màu xanh nhạt					
							+++ : Chồi đẹp, lá màu xanh đậm					

Ghi chú: Môi trường nền: MS + 30 g/l saccarose + Nồng độ BA thích hợp nhất cho từng dòng ở thí nghiệm 1 + 6,5 g/l agar ((2,0 mg/l BA (H1, H12, H37); 3,0 mg/l (H3, H5, H85))

Bảng 2 cho thấy: Bổ sung kinetin trên nền môi trường có BA đã cải thiện hệ số nhân chồi cũng như chất lượng chồi lan Huệ lai một cách rõ rệt so với công thức chỉ bổ sung BA đơn độc (Bảng 1). Các mẫu phát sinh chồi 100%, trong đó giống H5 đạt hệ số nhân cao nhất (3,32 chồi/mẫu) tiếp đến là giống H3 (2,55 chồi/mẫu). Thấp nhất ở giống H12 (2,06 chồi/mẫu). Các chồi tạo ra có lá màu xanh đậm, sinh trưởng, phát triển tốt.

3.1.2. Ảnh hưởng của sự phối hợp giữa auxin và cytokinin tới sự phát sinh hình thái từ vảy củ đôi

Thí nghiệm đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của các tổ hợp cytokinin (BA, Kinetin) và auxin (α NAA và IBA) đến khả năng tái sinh chồi từ nguồn vật liệu là vảy củ đôi. Các kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 3 và 4.



Hình 1. Kết quả nhân nhanh từ vảy củ đôi của 6 dòng lai Hoa Lan Huệ trên môi trường có bổ sung BA Kinetin, α NAA (sau 4 tuần)

Bảng 3. Ảnh hưởng của BA, kinetin và IBA đến khả năng tái sinh chồi *in vitro*, củ *in vitro* từ vảy củ đôi

IBA (mg/l)	Số chồi/mẫu						Chiều cao chồi (cm)						Đặc điểm chồi					
	H1	H3	H5	H12	H37	H85	H1	H3	H5	H12	H37	H85	H1	H3	H5	H12	H37	H85
0	2,43	2,55	3,32	2,41	2,49	2,29	7,21	7,55	8,76	9,21	8,43	7,12	++	++	++	++	++	++
0,25	3,02	3,21	3,56	2,55	2,65	2,76	8,13	11,22	12,24	13,33	9,88	7,98	+++	+++	+++	++	+++	++
0,5	2,37	2,67	3,38	2,49	2,51	2,32	7,62	9,10	9,35	10,81	9,11	8,34	++	++	++	+++	++	+++
0,75	2,92	2,78	3,12	2,87	2,94	1,95	6,44	6,12	8,45	8,66	6,23	7,21	++	+	++	++	+	+
1,0	2,61	2,01	2,88	1,93	2,09	1,19	7,55	8,96	7,97	7,45	6,44	6,53	+	+	+	+	+	+
LSD 5%	0,08	0,12	0,23	0,08	0,14	0,16	0,11	0,14	0,08	0,22	0,19	0,31						
CV (%)	3,1	4,2	3,6	5,1	4,3	3,8	2,6	4,4	3,2	4,2	5,4	3,4						

Ghi chú: Môi trường nền: MS + 30 g/l saccharose + BA (2,0-3,0 mg/l) (Kế thừa kết quả thí nghiệm 1 thích hợp cho từng dòng) + 1,0 mg/l Kinetin + 6,5 g/l agar.

Bảng 4. Ảnh hưởng của BA, kinetin và α NAA đến khả năng tái sinh chồi *in vitro*, củ *in vitro* từ vảy củ đôi

α NAA (mg/l)	Số chồi/mẫu						Chiều cao chồi (cm)						Đặc điểm chồi					
	H1	H3	H5	H12	H37	H85	H1	H3	H5	H12	H37	H85	H1	H3	H5	H12	H37	H85
0	2,01	2,43	2,89	2,22	2,52	2,41	7,33	9,45	11,57	9,32	8,56	7,21	++	++	++	++	++	++
0,25	3,07	3,36	3,75	2,87	2,78	2,84	9,23	13,65	14,23	11,11	8,98	8,22	++	++	++	++	++	++
0,5	2,81	2,65	2,62	2,31	2,61	2,45	7,61	8,18	10,82	8,49	10,12	8,47	++	++	++	+++	++	+++
0,75	2,33	3,03	2,39	2,00	2,44	1,88	6,23	11,64	9,46	7,88	7,33	7,54	++	+	++	++	+	+
1,0	2,09	1,98	3,16	1,80	1,91	1,79	7,35	7,93	8,39	6,11	7,12	6,67	+	+	+	+	+	+
LSD 5%	0,22	0,14	0,26	0,10	0,14	0,18	0,34	0,18	0,42	0,20	0,18	0,36						
CV (%)	3,8	5,6	3,8	4,2	3,8	5,4	3,0	5,0	3,6	4,4	5,8	3,2						

Ghi chú: Môi trường nền: MS + 30 g/l saccharose + BA (2,0-3,0 mg/l) (Kế thừa kết quả thí nghiệm 1 thích hợp cho từng dòng) + 1,0 mg/l Kinetin + 6,5 g/l agar.

+++ : Tốt (Chồi đẹp, màu lá xanh đậm); ++ : Trung bình (Chồi đẹp, lá xanh nhạt); + : Kém (Chồi kém, lá màu xanh nhạt)

a) Ảnh hưởng của BA, kinetin và IBA đến khả năng tái sinh chồi *in vitro*

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, các dòng lai H1, H12, H37 có môi trường MS + 2,0 mg/l BA + 1,0 mg/l kinetin + 0,25 mg/l IBA, dòng H3, H5, H85 có môi trường thích hợp MS + 3,0 mg/l BA + 1,0 mg/l kinetin + 0,25 mg/l IBA cho hiệu quả tái sinh cao. So với công thức đối chứng, số chồi/mẫu, chiều cao chồi và chất lượng chồi đều cao hơn. Số chồi đạt cao nhất ở giống H5 (3,56 chồi/mẫu), tiếp đến là H3 (3,02 chồi/mẫu) và hệ số nhân thấp nhất ở giống H12 đạt (2,55 chồi/mẫu) (Bảng 3).

b) Ảnh hưởng của BA, kinetin và α NAA đến khả năng tái sinh chồi *in vitro*

Các kết quả ở bảng 4 cho thấy tổ hợp BA, Kinetin và α NAA có ảnh hưởng ưu thế hơn khả năng tái sinh chồi *in vitro* từ vảy củ đôi so với tổ

hợp BA, Kinetin và IBA. Tuy nhiên chất lượng chồi tốt hơn thu được ở tổ hợp có bổ sung IBA. Công thức tối ưu cho tỷ lệ phát sinh chồi tốt nhất từ vảy củ đôi là: MS + 2,0-3,0 mg/l BA (Kế thừa kết quả từ thí nghiệm 3.1.1) + 1,0 mg/l kinetin + 0,25 mg/l α NAA cho hệ số nhân chồi cao hơn (từ 2,78-3,75 chồi/mẫu).

3.2. Nghiên cứu nhân nhanh từ vật liệu củ nhỏ *in vitro*

3.2.1. Ảnh hưởng của BA, kinetin và α NAA đến hệ số nhân chồi từ củ nhỏ *in vitro*

Từ kết quả trên cho thấy, hệ số nhân từ chồi *in vitro* cây Lan Huệ mạng chưa cao, chỉ đạt 3,75 chồi/mẫu. Đây chính là khó khăn trong quá trình nhân nhanh *in vitro* các loài thuộc chi *Hippeastrum*.

Trong quá trình tạo vật liệu khởi đầu, vảy củ đôi thường có xu hướng tạo củ nhỏ đồng thời với tạo chồi, chúng tôi đã sử dụng các củ nhỏ này cắt thành 4 phần đều nhau theo chiều dọc của củ, mỗi lát cắt đều chứa một phần đế củ và cấy vào môi trường MS + 1,0 mg/l kinetine + 0,25 mg/l α NAA + 30 g/l Saccarose + 100 ml/l ND + 6,5 g/l agar + BA ở các nồng độ khác nhau. Sau 2 tuần nuôi cấy các lát cắt này bắt đầu tạo chồi. Kết quả thí nghiệm (Bảng 5) sau 4 tuần nuôi cấy cho thấy. 100% mẫu bật chồi mới và số lượng chồi thu được khi bỏ củ cao hơn rõ rệt, đạt 5,65 chồi/mẫu (H12), 4,32 chồi/mẫu (H3). Các dòng lai còn lại đều đạt trên 4,0 chồi/mẫu (Bảng 5).

3.2.2. Ảnh hưởng của BA, Kinetin và IBA đến hệ số nhân chồi từ củ nhỏ *in vitro*

Kết quả thí nghiệm (Bảng 6) sau 4 tuần nuôi cấy cho thấy, 100% mẫu bật chồi mới và số lượng chồi thu được khi nhân từ củ nhỏ *in vitro* cao hơn so với công thức khi nhân từ vảy củ đôi rõ rệt, đạt 4,69 chồi/mẫu đối với dòng lai H12 và 4,57 chồi/mẫu đối với dòng lai H5. Các dòng lai còn lại đều đạt trên 4 chồi/mẫu (Bảng 6).

Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy, ảnh hưởng của việc bổ sung BA vào môi trường nhân giống là rất rõ rệt. Công thức không bổ sung BA cho hệ số nhân cao nhất cũng chỉ đạt 2,11 chồi/mẫu (H3) trong khi có BA hệ số nhân tối ưu đạt 4,69 chồi/mẫu (H12).

Qua kết quả từ hai thí nghiệm trên đây đã chứng minh ảnh hưởng tích cực của α NAA tới hệ số nhân chồi cây lan Huệ là cao hơn so với auxin IBA (Bảng 6).

Bảng 5. Ảnh hưởng của BA, kinetin và α NAA đến khả năng tái sinh chồi từ củ nhỏ *in vitro*

BA (mg/l)	Số chồi/mẫu						Đặc điểm chồi					
	H1	H3	H5	H12	H37	H85	H1	H3	H5	H12	H37	H85
0	1,41	2,11	1,21	1,22	1,09	1,29	+	+	+	+	+	+
1,0	2,37	2,55	2,23	2,30	2,15	2,07	+	++	+	++	+	+
2,0	2,55	2,43	3,21	2,66	2,56	2,12	++	++	+	++	+	++
3,0	2,92	4,32	3,12	3,87	3,21	2,67	++	+++	++	+	++	++
4,0	4,78	3,82	5,42	4,32	4,23	5,22	+++	++	+++	++	++	+++
5,0	3,22	2,51	4,12	5,65	5,34	3,09	++	+	++	+++	+++	++
LSD 5%	0,10	0,32	0,08	0,12	0,26	0,18						
CV (%)	3,0	2,6	4,8	3,2	5,4	3,6						

Ghi chú: Môi trường nền: MS + 1,0 mg/l Kinetin + 0,25 mg/l α NAA + 100 ml/l ND + 6,5 g/l agar

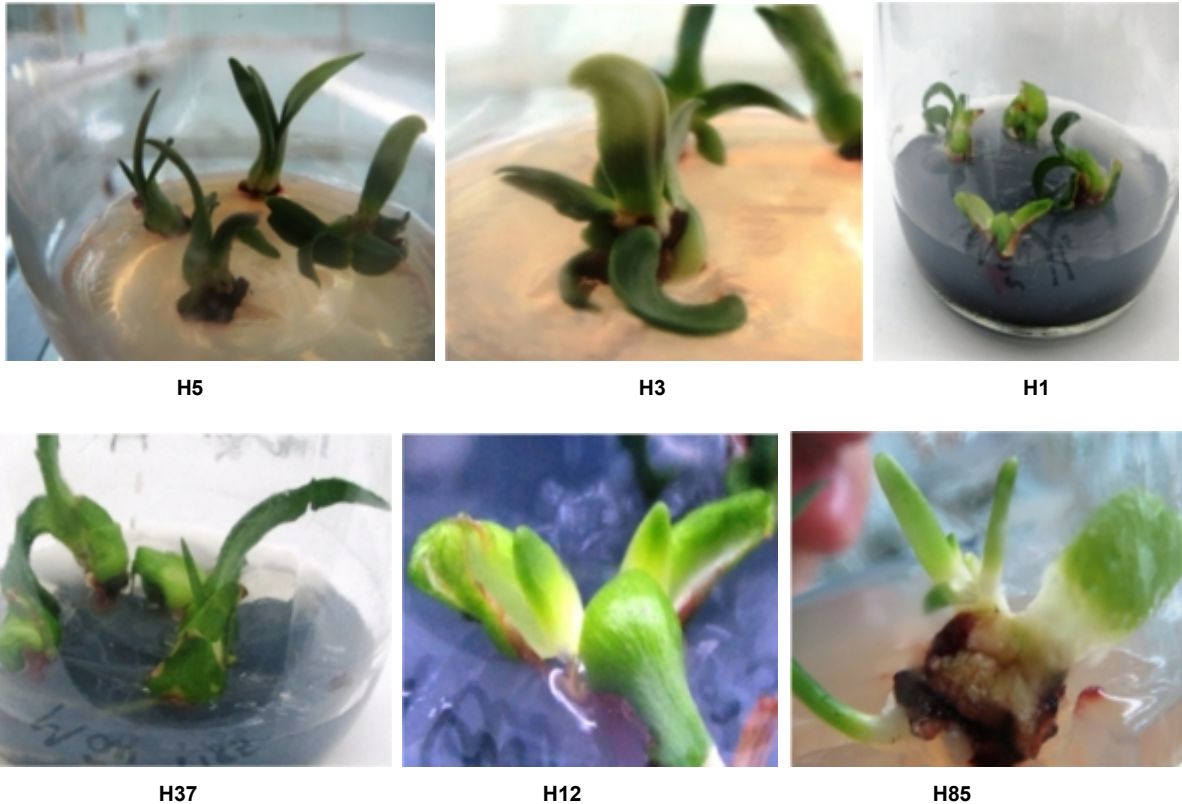
+++ : Tốt (Chồi đẹp, màu lá xanh đậm); ++ : Trung bình (Chồi đẹp, lá xanh nhạt); + : Kém (Chồi kém, lá màu xanh nhạt)

Bảng 6. Ảnh hưởng của BA, kinetin và IBA đến khả năng tái sinh chồi từ củ nhỏ *in vitro*

BA (mg/l)	Số chồi/mẫu						Đặc điểm chồi					
	H1	H3	H5	H12	H37	H85	H1	H3	H5	H12	H37	H85
0	1,21	1,42	1,63	1,32	1,38	1,34	+	+	+	+	+	+
1,0	2,31	2,32	2,78	2,45	2,28	2,21	+	++	+	++	+	+
2,0	2,45	3,39	3,19	2,87	2,66	2,26	++	++	+	++	+	++
3,0	3,19	4,10	3,07	3,92	3,09	2,98	++	+++	++	+	++	++
4,0	4,57	3,84	4,57	4,09	4,01	4,26	+++	++	+++	++	++	+++
5,0	3,22	2,71	4,12	4,69	4,34	3,49	++	+	++	+++	+++	++
LSD 5%	0,14	0,30	0,10	0,16	0,28	0,20						
CV (%)	3,2	2,2	4,0	3,8	4,6	3,0						

Ghi chú: Môi trường nền: MS + 1,0 mg/l Kinetin + 0,25mg/l IBA (Kế thừa từ kết quả thí nghiệm 3) + 6,5 g/l agar

+++ : Tốt (Chồi đẹp, màu lá xanh đậm); ++ : Trung bình (Chồi đẹp, lá xanh nhạt); + : Kém (Chồi kém, lá màu xanh nhạt)



Hình 2. Kết quả nhân nhanh từ củ nhỏ *in vitro* của 6 dòng lai hoa Lan Huệ trên môi trường có bổ sung BA, kinetin và α NAA (sau 4 tuần)

3.3. Tạo cây hoàn chỉnh

Kết quả nghiên cứu tạo rễ cho chồi lan Huệ được trình bày trong bảng 7 và 8. Kết quả cho thấy, rễ *in vitro* cây Lan Huệ lai có thể hình thành ngay trên môi trường MS không bổ sung chất điều tiết sinh trưởng, tuy nhiên thời gian ra rễ lâu và tỷ lệ tạo rễ cũng như số rễ/chồi thấp.

3.3.1. Ảnh hưởng của α NAA đến khả năng ra rễ cây Lan Huệ lai

Khi bổ sung α NAA vào môi trường thì tỷ lệ mẫu tạo rễ và số rễ/chồi đều đạt cao hơn, đặc biệt là ở công thức bổ sung 1,5 mg/l α NAA (tỷ lệ ra rễ 96,3-100%), tuy nhiên chiều dài rễ đạt cao nhất khi bổ sung vào môi trường 2,0 mg/l α NAA. Bảng 7 thể hiện khả năng ra rễ của chồi Lan Huệ lai trên môi trường chứa α NAA sau 8 tuần nuôi cấy.

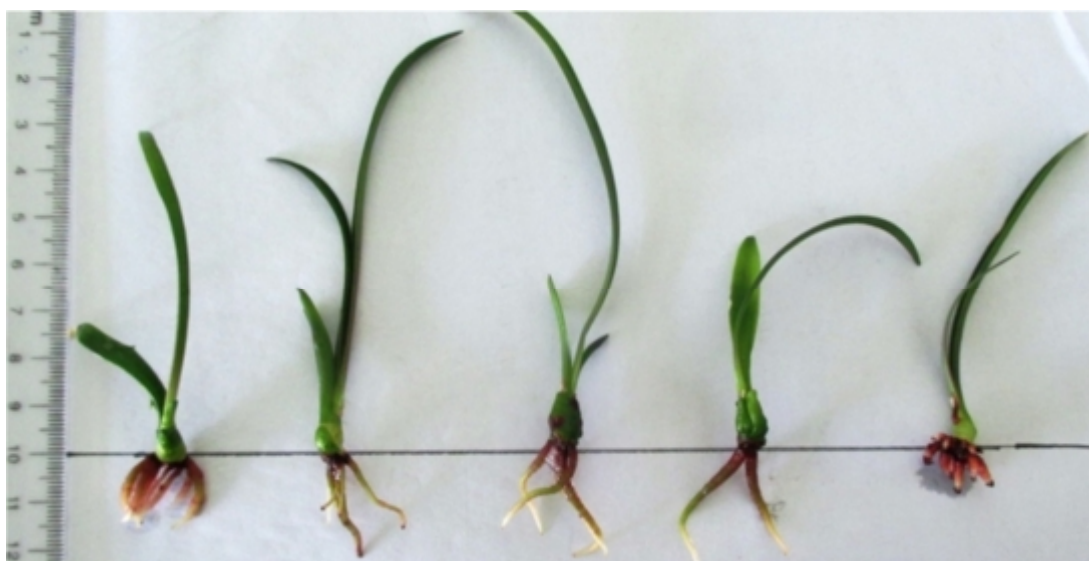
Khi bổ sung α -NAA vào môi trường nuôi cấy với dải nồng độ từ 0,5-2,0 mg/l, tỷ lệ hình thành rễ cao hơn. Bảng 7 cho thấy, khi tăng nồng độ α -

NAA, tỷ lệ hình thành rễ cũng tăng theo, số lượng rễ cũng tăng tùy dòng. Nồng độ thích hợp cho đa số các dòng lai này là từ 1,5-2,0 mg/l α NAA cho số lượng rễ khá cao đạt từ 4-6 rễ/chồi. Chất lượng rễ tốt, khỏe (Bảng 7)

3.3.2. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng ra rễ cây Lan Huệ lai

Vai trò tích cực của than hoạt tính đã được chứng minh trong nhiều nghiên cứu trên các đối tượng khác nhau (Nguyễn Quang Thạch và cs., 2004). Trong thí nghiệm này đã sử dụng than hoạt tính với các liều lượng khác nhau (0,1-0,7 g/l) bổ sung vào môi trường MS + 30 g/l saccarose + 6,5 g/l agar để xác định vai trò của than hoạt tính đối với sự ra rễ của cây Lan Huệ lai.

Kết quả thí nghiệm ở bảng 8 cho thấy, bổ sung than hoạt tính có tác dụng kích thích sự ra rễ mạnh mẽ. So với công thức bổ sung α NAA, số rễ tạo ra ít hơn nhưng chất lượng rễ của cây tốt hơn (ngắn, mập) (Bảng 8).



Hình 3. Rễ các dòng Lan Huệ lai sau 4 tuần

Bảng 7. Ảnh hưởng của α NAA đến khả năng ra rễ các dòng lan Huệ lai *in vitro*

α NAA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)						Số rễ/mẫu (rễ)						Đặc điểm rễ					
	H1	H3	H5	H12	H37	H85	H1	H3	H5	H12	H37	H85	H1	H3	H5	H12	H37	H85
0	23,6	13,1	21,3	19,7	22,8	13,4	1,21	1,42	1,63	1,32	1,38	1,34	+	+	+	+	+	+
0,5	33,1	35,3	41,4	37,9	33,2	39,1	2,31	2,32	2,78	2,45	2,28	2,21	+	++	+	++	+	+
1,0	86,7	96,4	93,2	87,4	76,9	83,8	2,45	3,39	3,19	2,87	2,66	2,26	++	++	+	++	+	++
1,5	100	100	96,3	100	99,6	100	3,19	4,10	3,07	3,92	3,09	2,98	++	+++	++	+	++	++
2,0	100	100	100	100	100	100	4,57	3,84	4,57	4,09	4,01	4,26	+++	++	+++	++	++	+++
LSD 5%							0,26	0,06	0,12	0,24	0,30	0,22						
CV (%)							3,2	4,3	3,7	3,9	4,1	4,9						

Ghi chú: Môi trường nền: MS + 100 ml/l ND + 6,5 g/l agar

Bảng 8. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng ra rễ các dòng lan Huệ lai *in vitro*

C (g/l)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)						Số rễ/mẫu (rễ)						Đặc điểm rễ					
	H1	H3	H5	H12	H37	H85	H1	H3	H5	H12	H37	H85	H1	H3	H5	H12	H37	H85
0	23,6	13,1	21,3	19,7	22,8	13,4	1,21	1,42	0,91	1,32	1,38	1,34	+	+	+	+	+	+
0,1	73,1	75,6	68,1	57,9	53,2	49,9	1,31	1,20	1,28	1,44	1,88	2,33	+	++	+	++	+	+
0,3	84,7	83,6	83,6	86,7	86,6	83,8	1,56	1,13	1,22	2,87	1,66	2,42	++	++	+	++	+	++
0,5	100	92,4	81,7	91,3	94,6	100	2,09	1,57	1,63	2,96	2,21	2,98	++	+++	++	+	++	++
0,7	88,3	84,9	87,8	77,4	88,1	100	2,57	1,69	1,79	2,65	2,73	2,56	+++	++	+++	++	++	+++
LSD 5%							0,3	0,08	0,06	0,09	0,12	0,21						
CV (%)							3,6	4,1	3,1	4,2	5,6	4,3						

Ghi chú: Môi trường nền: MS + 100 ml/l ND + 6,5 g/l agar

+++; Tốt (Rễ đẹp, mập, màu trắng); ++; Trung bình (rễ đẹp, màu trắng, mảnh); +; Kém (Rễ vàng và yếu)

3.4. Giai đoạn ngoài vườn ươm

Cây con *in vitro* được trồng ngoài vườn ươm trên các loại giá thể khác nhau:

CT1: Giá thể 100% cát

CT2: Giá thể 50% cát vàng + 50% trấu hun

CT3: Giá thể 75% cát vàng + 25% trấu hun

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của các loại

giá thể đến tỷ lệ sống và khả năng sinh trưởng của cây Lan Huệ *in vitro* được trình bày ở bảng 9. Giá thể cát: trấu hun với tỷ lệ 3:1 (v/v) với chế độ tưới 3 lần/ngày cho tỷ lệ sống sót cao nhất đạt 100%, cây sinh trưởng phát triển khỏe mạnh.

Trên giá thể này, số rễ mới tạo ra nhiều, chiều dài rễ dài nhất 4,95cm (H1) và 3,91cm (H37).

Bảng 9. Ảnh hưởng của các loại giá thể đến sự sinh trưởng và phát triển của cây Lan Huệ lai sau *in vitro* (Sau 4 tuần ra cây)

Giá thể	Số rễ mới (rễ)						Chiều dài rễ (cm)					
	H1	H3	H5	H12	H37	H85	H1	H3	H5	H12	H37	H85
CT1	1,21	0,95	1,10	1,12	1,31	1,14	2,00	2,43	2,76	2,13	1,88	2,51
CT2	1,33	0,65	0,74	1,03	1,66	1,98	2,12	2,35	2,93	2,31	2,02	2,06
CT3	2,22	2,15	3,76	2,44	2,41	3,95	3,92	4,52	4,95	3,82	3,91	5,02
LSD 5%		0,16	0,06	0,12	0,14	0,20	0,22	0,08	0,16	0,24	0,10	0,18
CV (%)		2,4	4,3	3,7	3,3	3,6	3,1	2,00	2,4	3,2	2,6	2,00

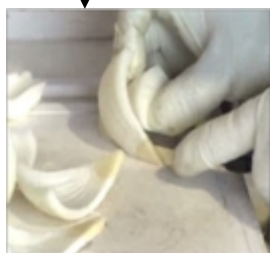


Hình 4. Hình ảnh các dòng lan Huệ lai ngoài vườn ươm sau 4 tuần ra cây

QUY TRÌNH NUÔI CẤY MÔ SÁU DÒNG HOA LAN HUỆ LAI



Củ cây hoa Lan Huệ lai



Để củ dính 2 vẩy củ cây vào MS + 5,5 g/l agar (sau 2 tuần)



Môi trường khởi động: 100% mẫu phát sinh chồi sau 4 tuần

H1: 3,0 mg/l BA + 1,0 mg/l Kinetin + 0,25 mg/l αNAA

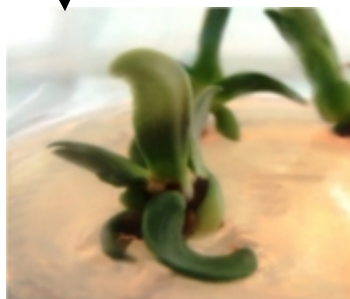
H3: 3,0 mg/l BA + 1,0 mg/l Kinetin + 0,25 mg/l αNAA

H5: 3,0 mg/l BA + 1,0 mg/l Kinetin + 0,25 mg/l αNAA

H12: 2,0 mg/l BA + 1,0 mg/l Kinetin + 0,25 mg/l αNAA

H37: MS + 3,0 mg/l BA + 1,0 mg/l Kinetin + 0,25 mg/l αNAA

H85: MS + 3,0 mg/l BA + 1,0 mg/l Kinetin + 0,25 mg/l αNAA

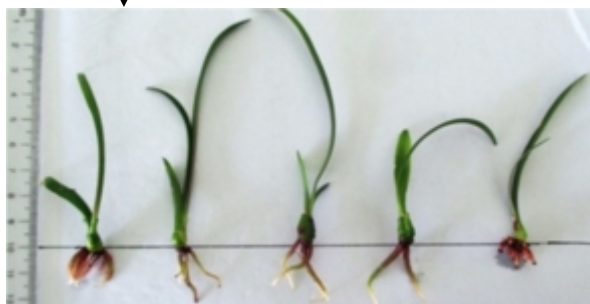


Nhanh từ củ nhỏ: Hệ số nhân cao nhất đạt 5,65 chồi/mẫu

H1, H5, H85: MS + 4,0 mg/l BA + 1,0 mg/l Kinetin + 0,25 mg/l αNAA

H3: MS + 3,0 mg/l BA + 1,0 mg/l Kinetin + 0,25 mg/l αNAA

H12, H37: MS + 5,0 mg/l BA + 1,0 mg/l Kinetin + 0,25 mg/l αNAA



Ra cây



100% chồi ra rễ sau 4 tuần

H1, H5, H12, H37, H85: MS + 2,0 mg/l αNAA

H3: MS + 1,5 mg/l αNAA

75% cát : 25% trấu hun

Tỷ lệ sống 100%

4. KẾT LUẬN

4.1. Giai đoạn phát sinh hình thái của mẫu nuôi cấy từ vảy củ dôi

Môi trường tối ưu cho sự phát sinh hình thái của dòng lai hoa Lan Huệ:

Dòng lai H1: 3,0 mg/l BA + 1,0 mg/l Kinetin + 0,25 mg/l α NAA cho 3,07 chồi/mẫu

Dòng lai H3: 3,0 mg/l BA + 1,0 mg/l Kinetin + 0,25 mg/l α NAA cho 3,36 chồi/mẫu

Dòng lai H5: 3,0 mg/l BA + 1,0 mg/l Kinetin + 0,25 mg/l α NAA cho 3,75 chồi/mẫu

Dòng lai H12: 2,0 mg/l BA + 1,0 mg/l Kinetin + 0,25 mg/l α NAA cho 2,87 chồi/mẫu

Dòng lai H37: MS + 3,0 mg/l BA + 1,0 mg/l Kinetin + 0,25 mg/l α NAA cho 2,78 chồi/mẫu

Dòng lai H85: MS + 3,0 mg/l BA + 1,0 mg/l Kinetin + 0,25 mg/l α NAA cho 2,84 chồi/mẫu

4.2. Giai đoạn nhân nhanh từ củ nhỏ *in vitro*

Môi trường tối ưu cho hệ số nhân chồi cao nhất là:

Môi trường nền: MS + 1,0 mg/l kinetin + 0,25 mg/l α NAA + 30 g/l saccarose + 100ml/l ND + 5,5 g/l agar.

Dòng lai H1: 4,0 mg/l BA cho 4,78 chồi/mẫu.

Dòng lai H3: 3,0 mg/l BA cho 4,32 chồi/mẫu.

Dòng lai H5: 4,0 mg/l BA cho 5,42 chồi/mẫu.

Dòng lai H12: 5,0 mg/l BA cho 5,65 chồi/mẫu.

Dòng lai H37: 5,0 mg/l BA cho 5,34 chồi/mẫu.

Dòng lai H85: 4,0 mg/l BA cho 5,22 chồi/mẫu.

4.3. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Môi trường ra rễ phù hợp nhất cho 6 dòng lai hoa Lan Huệ là: MTN: MS + 30 g/l saccarose + 100 ml/l ND + 5,5 g/l agar.

Dòng lai H1, H5, H12, H37, H85: 2,0 mg/l α NAA.

Dòng lai H3: 1,5 mg/l α NAA.

4.4. Giai đoạn vườn ươm

Giá thể phù hợp nhất cho sự sinh trưởng cây lan Huệ *in vitro* ngoài vườn ươm là: 75% cát: 25% trấu hun.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài khoa học công nghệ cấp Bộ, mã số B2013_11_29.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Đức Lượng, Lê Thị Thủy Tiên (2002). Công nghệ tế bào. Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia, thành phố Hồ Chí Minh.
- Đinh Thị Phòng, Nguyễn Thị Lý Anh (2007). Công nghệ nuôi cấy mô. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- Ninh Thị Thảo, Nguyễn Thị Cúc, Nguyễn Hạnh Hoa, Nguyễn Thị Phương Thảo (2009). “Bước đầu nghiên cứu quy trình nhân nhanh *in vitro* cây hoa Loa Kèn đỏ nhưng (*Hippeastrum equestre* Herb)”. Tạp chí Khoa học và Phát triển, 7(4): 453-459.
- Ninh Thị Thảo, Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Hạnh Hoa (2010). “Nghiên cứu quy trình nhân nhanh *in vitro* cây Lan Huệ Mạng *Hippeastrum reticulatum* Herb. var. *Striatifolium* Herb”. Tạp chí Khoa học và Phát triển, 8(3): 426-432.
- Nguyễn Thị Phương Thảo (1998). Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây hoa Loa Kèn. Luận văn Thạc sĩ Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.
- Nguyễn Quang Thạch (chủ biên), Nguyễn Thị Lý Anh, Nguyễn Thị Phương Thảo (2004). Giáo trình công nghệ sinh học nông nghiệp, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
- Chieh Li Huang, Kuo Cheng Chang & Hiroshi Okubo (2005). *In vitro* morphogenesis from ovaries of *Hippeastrum* x *Hybridum*. J. Fac. Agr. Kyushu Univ., 50(1): 19-25.
- De Bruyn M.H, Ferreira D.I., Slabbert M.M. & Pretorius J. (1992). *In vitro* propagation of *Amaryllis belladonna*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 31: 179-184.
- Epharath J.E., Ben-Asher., Baruchin F., Alekperov C., Dayan E. & Silerbush M. (2001). Various cutting methods for the propagation of *Hippeastrum bulbs*. Biotronics 30: 75-83.
- Hussey G. (1975). Totipotency in tissue explants and callus of some members of the Liliaceae, Iridaceae and Amaryllidaceae. J. Exp. Bot. 26: 253-262.
- O'Rourke E.N., Fountain W.M. & Sharghi. S. (1991). Rapid propagation of *Hippeastrum bulblets* by *in vitro* culture. *Herbertia* 47(1): 54-55.