

NHÂN NHANH HOA HOÀNG LAN BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY PHÔI SOMA

BÙI THỊ TƯỜNG THU, TRẦN VĂN MINH

Viện Sinh học nhiệt đới

Vi nhân giống truyền thống trên loài hoa lan hiện nay dẫn đến một vấn đề mà các phòng thí nghiệm vi nhân giống thường gặp phải đó là tốn nhiều chi phí lao động để sản xuất cây con với khối lượng lớn, khi đưa ra thị trường giá thành cây con lại cao [7]. Hệ thống nhân giống bằng phôi vô tính [2] sẽ giải quyết được rào cản nêu trên với các lợi thế: nhân nhanh dưới dạng tế bào, phôi vô tính là một thể biệt hóa có hệ số tái sinh cao, tốn ít chi phí lao động và giá thành hạ [4]. Vật liệu khởi đầu là thể phôi giả (PLB) và bẹ lá non in vitro trong nuôi cấy phôi vô tính có vai trò đảm bảo được đặc điểm di truyền bố mẹ và duy trì hệ số tái sinh cao trong thời gian dài [9]. Môi trường nuôi cấy phôi vô tính thích hợp chiếm vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng và biệt hóa tế bào phôi [1]. Điều khiển quá trình biệt hóa và tái sinh phôi vô tính dưới tác động của các chất điều hòa sinh trưởng BA, kinetin, TDZ, NAA đã trở thành quy luật [3]. PLB là một thể đa phôi phôi đặc biệt phát sinh trong nuôi cấy các loài hoa lan chịu nhiều tác động của cytokinin [8]. Nghiên cứu tạo mô sẹo phôi hóa, nuôi cấy tạo phôi soma, và tái sinh phôi soma là rào cản đầu tiên trong kỹ thuật nuôi cấy phôi soma [5, 10]. Bài báo này nghiên cứu nhân nhanh hoa hoàng lan thông qua kỹ thuật nuôi cấy phôi soma.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Nguyên liệu là giống hoa hoàng lan *Dendrobium cv. sonia earsakul* nhập nội từ Singapore. Mẫu nuôi cấy: (i) Corm đỉnh sinh trưởng chồi in vitro 20 ngày tuổi; (ii) Lá non (còn bẹ lá trắng) chồi in vitro 20 ngày tuổi; (iii) PLB được cắt lát mỏng.

2. Phương pháp

Môi trường dinh dưỡng khoáng cơ bản được sử dụng trong nuôi cấy là MS (Murashige & Skoog, 1962) [6]. Có bổ sung: BA (6-benzylaminopurine), TDZ (thidiazuron), kinetin (6-furfurylaminopurine), IAA (β -indolacetic acid), IBA (β -indolacetic acid), NAA (α -naphthalene acetic acid), B1 (5 mg/l), nước dừa, đường sucrose (30 g/l).

Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ phòng $26 \pm 2^\circ\text{C}$, RH = 65%, thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng $33,3 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, tốc độ lắc 100 rpm.

Thiết kế thí nghiệm: bố trí theo khối đầy đủ ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại nuôi cấy 3 bình tam giác (chứa 60 ml môi trường bán rắn hay 50 ml môi trường lỏng). Số liệu được phân tích bằng phương pháp MSTATC ($t = 0,05$).

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Nuôi cấy tạo thể phôi PLB

Chồi non hoa lan in vitro có độ tuổi 20 ngày nuôi cấy được sử dụng làm nguyên liệu nuôi cấy. Mẫu nuôi cấy là lá non còn bẹ trắng. Mẫu được nuôi cấy trên môi trường tạo phôi PLB: MS + CW (10%) có bổ sung IAA, IBA, NAA, BA và TDZ.

Kết quả nghiên cứu cho thấy (bảng 1): Sau 45 ngày, PLB xuất hiện mạnh trên môi trường nuôi cấy MS + CW (10%) có bổ sung các tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng IBA+BA, IAA+BA. Bổ sung tổ hợp TDZ+NAA và TDZ cho phát sinh 3,4-8,2 PLB/mẫu nuôi cấy; trong đó tổ hợp TDZ (1 mg/l) + NAA (0,5 mg/l) đạt hiệu suất tạo 8,2 PLB/mẫu. PLB được tách rời khỏi mẫu nuôi cấy, được sử dụng làm nguyên liệu cho nghiên cứu vi nhân giống hay nuôi cấy tạo tế bào soma.

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến phát sinh thể phôi PLB

Chất điều hòa sinh trưởng	Tỷ lệ phát sinh PLB (%)	Số PLB /mẫu
2,4D (0,1 mg/l)	100	1,2
2,4D (0,2 mg/l)	100	1,5
2,4D (0,3 mg/l)	100	1,6
2,4D (0,4 mg/l)	100	1,8
2,4D (0,5 mg/l)	100	2,0
2,4D (1 mg/l)	92	2,2
2,4D (1 mg/l) + NAA (1 mg/l)	83	2,0
IBA (0,5 mg/l)	100	2,4
IBA (0,5 mg/l) + BA (1 mg/l)	80	3,6
IAA (0,5 mg/l)	100	2,2
IAA (0,5 mg/l) + BA (1 mg/l)	100	3,4
Kinitin (0,5 mg/l) + 2,4D (0,5 mg/l)	100	2,6
Kinitin (0,5 mg/l) + IAA (0,5 mg/l)	100	2,8
Kinitin (2 mg/l) + 2,4D (0,5 mg/l)	80	3,8
Kinitin (2 mg/l) + IAA (0,5 mg/l)	93	4,2
TDZ (1 mg/l)	92	5,8
TDZ (3 mg/l)	96	2,8
NAA (0,5 mg/l)	100	2,6
TDZ (1 mg/l) + NAA (0,5 mg/l)	100	8,2
TDZ (3 mg/l) + NAA (0,5 mg/l)	100	5,6
CV%	12,8	9,4

2. Nuôi cấy tạo dịch huyền phù mô sẹo phôi hóa

Mẫu nuôi cấy là PLB được cắt thành từng lát mỏng dày 1 mm và được đưa vào nuôi cấy trên môi trường phát sinh mô sẹo phôi hóa MS + CW (30%) có bổ sung 2.4D (0-0,3-0,5 mg/l).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sau 4 tuần nuôi cấy, mô sẹo hình thành trên bề mặt lát

cắt, trên môi trường agar MS + CW (30%) + 2.4D (0,5 mg/l). Lát cắt có mô sẹo được đưa vào nuôi cấy trong môi trường lỏng MS + CW (30%) + 2.4D (0,5 mg/l), sau 8 tuần nuôi cấy, lọc loại bỏ lát cắt PLB, được dịch huyền phù tế bào mô sẹo. Môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo là MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng (0-PGR) và phát sinh tạo dịch huyền phù tốt nhất là MS + CW (30%) + 2.4D (0,3 mg/l) (bảng 2).

Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến phát sinh mô sẹo

Môi trường nuôi cấy		Tỷ lệ phát sinh mô sẹo (%)	Tạo dịch huyền phù tế bào mô sẹo (mg/50ml)
Trên agar (4 tuần)	Trong lỏng (4 tuần)		
2.4D (0,3 mg/l)	2.4D (0,3 mg/l)	50	1.286
2.4D (0,5 mg/l)	2.4D (0,5 mg/l)	70	1.864
2.4D (0,0 mg/l)	2.4D (0,3 mg/l)	100	1.483
CV%		12	10,8

3. Nuôi cấy tăng sinh tế bào mô sẹo phôi hóa

Mô sẹo từ nghiên cứu trên được sử dụng trong nghiên cứu nuôi cấy tăng sinh mô sẹo phôi hóa. Khối lượng mô sẹo đưa vào nuôi cấy

500 mg/mẫu. Môi trường nuôi cấy tăng sinh mô sẹo phôi hóa MS + CW (10%) có bổ sung NAA (0-0,1-0,5-1,0 mg/l) và 2.4D (0-0,1-0,5-1,0 mg/l) và đối chứng không bổ sung chất điều hòa

sinh trưởng (0-PGR).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sau 30 ngày nuôi cấy, mô sẹo phôi hóa tăng sinh nhanh trên môi trường có bổ sung NAA (0,5 mg/l) + 2.4D (0,1 mg/l) đạt hệ số tăng sinh 4,6 và cao hơn so với đối chứng (hệ số tăng sinh 2,2) (bảng 3).

Theo nhiều tác giả, do mô sẹo hoa hoàng lan có hiện tượng hoại tử sau thời gian dài nuôi cấy, nên môi trường duy trì tăng sinh mô sẹo phôi hóa là môi trường nuôi cấy cách quãng có bổ sung NAA (0,5 mg/l) + 2.4D (0,1 mg/l) và 0-PGR là thích hợp.

Bảng 3

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến tăng sinh tế bào mô sẹo

Môi trường nuôi cấy		Sinh khối tế bào mô sẹo sau 30 ngày nuôi cấy (mg)	Hệ số tăng sinh sau 30 ngày nuôi cấy
NAA (mg/l)	2.4D (mg/l)		
0,0	0,0	1.146	2,2
0,1	-	1.425	2,8
0,5	-	1.628	3,2
1,0	-	1.846	3,6
-	0,1	1.245	2,4
-	0,5	1.672	3,2
-	1,0	1.656	3,8
0,5	0,1	2.374	4,6
0,5	0,5	2.136	4,2
CV%		12,4	9,6

4. Ảnh hưởng của mô nuôi cấy đến tái sinh mô sẹo phôi hóa

Mẫu nuôi cấy là PLB được cắt thành từng lát mỏng dày 1 mm và lá non tách rời còn bẹ trắng (chồi in vitro 10-20 mm), chồi đỉnh và hạt lai được sử dụng làm nguyên liệu nuôi cấy tạo mô sẹo phôi hóa. Khối lượng mô sẹo đưa vào nuôi cấy tái sinh là 500 mg/mẫu.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sau 30 ngày nuôi cấy: Trên môi trường nuôi cấy phát sinh tạo mô sẹo phôi hóa: MS + 2.4D (0,5 mg/l) + CW (10%). Cả bốn loại mô đưa vào nuôi cấy đều phát sinh mô sẹo phôi hóa (72-92% mẫu tạo

mô sẹo) (bảng 4). Mô sẹo phôi hóa tăng sinh nhanh trong nuôi cấy kéo dài. Mô sẹo phôi hóa đặt dưới ánh sáng có điểm xanh. Mô sẹo phôi hóa đặt dưới ánh sáng khuếch tán có màu trắng ngà. Mô sẹo xanh được sử dụng trong nghiên cứu tái sinh, mô sẹo vàng ngà thích hợp cho nuôi cấy tăng sinh trong môi trường lỏng.

Môi trường nuôi cấy tái sinh mô sẹo phôi hóa: MS + NAA (0,1 mg/l) + BA (0,5 mg/l). Sau 30 ngày nuôi cấy: Mô sẹo phôi hóa từ bốn loại mô đưa vào nuôi cấy đều có khả năng tái sinh cao. Hiệu suất tái sinh 100% loại mẫu đưa vào nuôi cấy. Số chồi đạt trung bình 6,2-8,6 chồi/mẫu nuôi cấy.

Bảng 4

Ảnh hưởng của mô nuôi cấy đến tái sinh mô sẹo

Mẫu nuôi cấy	Môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo (sau 30 ngày nuôi cấy)		Hiệu suất tái sinh (chồi/cụm)
	Tỷ lệ tạo mô sẹo (%)	Hệ số tăng sinh cấy truyền	
Lát cắt PLB	74	3,8	8,4
Bẹ lá non	92	4,2	6,2
Từ chồi đỉnh	74	3,6	8,6
Từ hạt lai	72	3,8	7,2

5. Tái sinh mô sẹo phôi hóa

Mô sẹo từ nghiên cứu trên được sử dụng

trong nghiên cứu tái sinh mô sẹo phôi hóa. Khối lượng mô sẹo đưa vào nuôi cấy 500 mg/mẫu đã

được cấy truyền 6 lần. Môi trường nuôi cấy tái sinh mô sẹo phôi hóa MS + CW (10%) có bổ sung NAA (0-0,1-0,5-1,0 mg/l) và 2.4D (0-0,1-0,5-1,0 mg/l) và đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng (0-PGR).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sau 30

ngày nuôi cấy, tỷ lệ tái sinh đạt 74-100% trên các nghiệm thức chất điều hòa sinh trưởng bổ sung. Số chồi đạt cao 6,8 chồi/cụm ở tổ hợp NAA (0,1 mg/l) + BA (0,1 mg/l) (bảng 5). Tỷ lệ tái sinh cao ở mô sẹo, cho thấy tế bào mô sẹo phôi hóa là đơn vị nhân giống thích hợp trong nuôi cấy lỏng.

Bảng 5

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến tái sinh mô sẹo phôi hóa

Chất điều hòa sinh trưởng		Tỷ lệ tái sinh (%) sau 30 ngày nuôi cấy	Số chồi /cụm
NAA (mg/l)	BA (mg/l)		
0,0	0,0	74	2,0
0,1	-	76	3,2
0,5	-	82	2,2
1,0	-	84	1,8
-	0,1	100	3,6
-	0,5	100	4,2
-	1,0	100	3,8
0,1	0,1	100	6,8
0,1	0,5	100	4,4
0,1	1,0	100	4,2
CV%		10,6	8,8

6. Nuôi cấy tăng sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa:

Mô sẹo từ nghiên cứu trên được sử dụng trong nghiên cứu tăng sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa. Khối lượng mô sẹo đưa

vào nuôi cấy 1g/50ml thể tích môi trường đã được cấy truyền 6 lần. Môi trường lỏng nuôi cấy tăng sinh mô sẹo phôi hóa MS + CW (10%) có bổ sung NAA (0-0,1-0,5-1,0 mg/l) và 2.4D (0-0,1-0,5-1,0 mg/l) và đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng (0-PGR).

Bảng 6

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến tăng sinh dịch huyền phù mô sẹo

Môi trường nuôi cấy		Sinh khối dịch huyền phù tế bào mô sẹo (mg)	Hệ số tăng sinh
NAA (mg/l)	2.4D (mg/l)		
0,0	0,0	2.248	3,2
0,1	-	5.672	5,6
0,5	-	4.274	4,2
1,0	-	2.834	2,8
-	0,1	5.896	5,8
-	0,5	4.688	4,6
-	1,0	3.282	3,2
0,5	0,1	11.496	11,4
0,5	0,5	8.224	8,2
CV%		14,2	8,8

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sau 30 ngày nuôi cấy, dịch huyền phù mô sẹo phôi hóa tăng sinh nhanh trên môi trường có bổ sung NAA

(0,5 mg/l) + 2.4D (0,1 mg/l), đạt hệ số tăng sinh 11,4 và cao hơn so với đối chứng (hệ số tăng sinh 2,2) (bảng 6). Theo nhiều tác giả, do mô

sẹo hóa hoàng lan có hiện tượng hoại tử sau thời gian dài nuôi cấy, nên môi trường duy trì tăng sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa là môi trường nuôi cấy cách quãng có bổ sung NAA (0,5 mg/l) + 2.4D (0,1 mg/l) và 0-PGR là thích hợp hơn cả.

7. Nuôi cấy cảm ứng phát sinh phôi

Nuôi cấy cảm ứng phát sinh phôi là nuôi cấy kích thích mô sẹo phôi hóa biệt hóa thành phôi soma trong môi trường nuôi cấy lỏng. Dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa được cấy truyền 6 lần được sử dụng làm nguyên liệu nuôi cấy. Khối lượng tế bào đưa vào nuôi cấy là

10 g/50 ml thể tích môi trường. Môi trường nuôi cấy hoạt hóa phát sinh phôi MS + CW (10%) có bổ sung NAA (0,1 mg/l) + BA(0,1 mg/l).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sau 4 tuần nuôi cấy, hiệu suất hoạt hóa phát sinh phôi (tế bào phôi hình cầu, hình tim, hình thủy lôi) đạt cao nhất 88,4% trên môi trường nuôi cấy MS + CW (10%) + NAA (0,1 mg/l) + BA (0,1 mg/l) (bảng 7). Tốc độ tăng sinh giảm nhanh, ngược lại tốc độ phân hóa phôi tăng nhanh. Dịch huyền phù phân hóa phôi cao sau 4 tuần nuôi cấy, sau giai đoạn này tế bào mô sẹo tăng sinh khối, làm giảm hiệu suất hoạt hóa (42,4% sau 6 tuần nuôi cấy).

Bảng 7

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hiệu suất hoạt hóa cảm ứng phát sinh phôi

Thời gian nuôi cấy (tuần)	Mật độ tế bào hoạt hoá (CFU/ml) sau 4 tuần	Hiệu suất hoạt hoá (%) so với mật độ tế bào ban đầu
1	$0,8 \times 10^4$	58,0
2	$0,9 \times 10^4$	68,3
3	$1,2 \times 10^4$	82,6
4	$1,4 \times 10^4$	88,4
5	$0,8 \times 10^4$	50,6
6	$0,7 \times 10^4$	42,4
CV%	12,4	9,2

8. Trải và tái sinh tế bào phôi soma trên môi trường agar

Bảng 8

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến tái sinh phôi

Môi trường nuôi cấy có bổ sung			Tỷ lệ tái sinh (%)	Số chồi /5ml dịch huyền phù tế bào phôi
NAA (mg/l)	BA (mg/l)	TDZ (mg/l)		
-	-	-	86	12
0,1	-	-	68	10
0,2	-	-	72	8
-	0,1	-	100	16
-	0,2	-	100	18
-	-	0,1	92	14
-	-	0,2	78	16
0,1	0,1	-	100	22
0,1	0,2	-	100	24
0,1	-	0,1	100	15
0,1	-	0,2	100	18
CV%			10.8	10

Dịch huyền phù tế bào phôi hóa được sử dụng làm nguyên liệu nuôi cấy. Thể tích trải

nuôi cấy 5 ml/60 ml môi trường nuôi cấy bán rắn. Môi trường nuôi cấy trải và tái sinh dịch

huyền phù phôi soma MS + CW (10%) có bổ sung NAA (0,1-0,2 mg/l), TDZ (0,1-0,2 mg/l), BA(0,1-0,2 mg/l), và đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng (0-PGR).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sau 45 ngày nuôi cấy: TDZ ức chế quá trình phát sinh mô sẹo, tế bào bị hoại tử cao, hạn chế tỷ lệ tái sinh. Môi trường nuôi cấy có bổ sung tổ hợp NAA (0,1 mg/l) + BA (0,2 mg/l) và môi trường 0-PGR, cho phát sinh mô sẹo đi đôi với tái sinh (bảng 8). Số chồi đỉnh đạt cao (24 chồi đỉnh/5 ml dịch huyền phù tế bào phôi nuôi cấy) trên môi trường MS + CW (10%) có bổ sung tổ hợp NAA (0,1 mg/l) + BA (0,2 mg/l). Sau 60 ngày nuôi cấy, mô sẹo phát triển nhanh trên môi trường có bổ sung tổ hợp NAA (0,1 mg/l) + BA (0,2 mg/l), đi đôi với sự hình thành cụm chồi từ mẫu mô phôi nuôi cấy.

III. KẾT LUẬN

Nuôi cấy tạo thể phôi PLB: Chồi non hoa lan in vitro có độ tuổi 20 ngày nuôi cấy được sử dụng làm nguyên liệu nuôi cấy. Mẫu nuôi cấy là lá non còn bẹ trắng. PLB xuất hiện mạnh trên môi trường nuôi cấy MS + CW (10%) có bổ sung tổ hợp TDZ (1 mg/l) + NAA (0,5 mg/l) đạt hiệu suất tạo 8,2 PLB/mẫu. PLB được tách rời khỏi mẫu nuôi cấy, được sử dụng làm nguyên liệu cho nghiên cứu vi nhân giống hay nuôi cấy tạo tế bào soma.

Nuôi cấy tạo dịch huyền phù mô sẹo phôi hóa: Mô sẹo hình thành trên lát cắt PLB trên môi trường agar MS + CW (30%) + 2.4D (0,5 mg/l) sau 4 tuần nuôi cấy. Lát cắt PLB có mô sẹo được đưa vào nuôi cấy trong môi trường lỏng MS + CW (30%) + 2.4D (0,5 mg/l), sau 8 tuần nuôi cấy, thu nhận dịch huyền phù tế bào mô sẹo.

Nuôi cấy tăng sinh tế bào mô sẹo phôi hóa: Môi trường nuôi cấy tăng sinh mô sẹo phôi hóa MS + CW (10%) có bổ sung NAA (0,5 mg/l) + 2.4D (0,1 mg/l) đạt hệ số tăng sinh 4,6 cao hơn so với đối chứng 2,2.

Ảnh hưởng của mô nuôi cấy đến tái sinh mô sẹo phôi hóa: Sau 30 ngày nuôi cấy: Trên môi trường nuôi cấy phát sinh tạo mô sẹo phôi hóa: MS + 2.4D (0,5 mg/l) + CW (10%). Cả bốn loại mô đưa vào nuôi cấy đều phát sinh mô sẹo phôi hóa. Trên môi trường nuôi cấy tái sinh mô sẹo

phôi hóa: MS + NAA (0,1 mg/l) + BA (0,5 mg/l). Mô sẹo phôi hóa từ hai loại mô nuôi cấy đều có hiệu suất tái sinh 100%, đạt 6-8 chồi/mẫu nuôi cấy.

Tái sinh mô sẹo phôi hóa: Môi trường nuôi cấy tái sinh mô sẹo phôi hóa MS + CW (10%) + NAA (0,1 mg/l) + BA (0,1 mg/l). Sau 30 ngày nuôi cấy: Tỷ lệ tái sinh đạt 74-100% trên các nghiệm thức. Số chồi đạt cao 6,8 chồi/cụm.

Nuôi cấy tăng sinh dịch huyền phù tế bào mô sẹo phôi hóa: Môi trường lỏng nuôi cấy tăng sinh mô sẹo phôi hóa MS + CW (10%) có bổ sung NAA (0,5 mg/l) + 2.4D (0,1 mg/l) có hệ số tăng sinh 11,4 và cao hơn so với đối chứng (hệ số tăng sinh 2,2) sau 30 ngày nuôi cấy.

Nuôi cấy cảm ứng phát sinh phôi: Hiệu suất hoạt hóa (tế bào phôi hình cầu, hình tim, hình thủy lồi) đạt 88,4% trên môi trường nuôi cấy MS + CW (10%) + NAA (0,1 mg/l) + BA (0,1 mg/l) sau 30 ngày nuôi cấy.

Trái và tái sinh tế bào phôi soma trên môi trường agar: Dịch huyền phù tế bào phôi hóa được trải nuôi cấy 5 ml/60 ml trên môi trường nuôi cấy bán rắn MS + CW (10%) có bổ sung tổ hợp NAA (0,1 mg/l) + BA (0,2 mg/l). Sau 45 ngày nuôi cấy: cho phát sinh mô sẹo đi đôi với tái sinh tới 24 chồi đỉnh/5ml dịch huyền phù tế bào phôi.

Lời cảm ơn: Chân thành cảm ơn Văn phòng Các chương trình trọng điểm cấp nhà nước và Chương trình Công nghệ sinh học KC04 đã cấp kinh phí thực hiện đề tài KC04.15/06-10 “Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy lát mỏng tế bào, công nghệ phôi soma và bioreactor trong nhân nhanh các cây trồng kinh tế”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Arditti J.**, 2008: Micropropagation of orchids. Blackwell Publishing, 1523 pages.
2. **Chandler S. F., Lu C. Y.**, 2005: Biotechnology in ornamental horticulture. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, 41: 591-601.
3. **Chung H. H., Chen J. T., Chang W. C.**, 2005: Cytokinin induce direct somatic embryogenesis of Dendrobium Chiangmai Pink and subsequent plant regeneration. In Vitro Cell Dev. Biol. - Plant, 41: 765-769.

4. **Gamborg O. L.**, 2002: Plant tissue culture: biotechnology and milestones. In *Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 38: 84-92.
5. **Jaime A., Teixeira da Silva, Singh N., Tanaka M.**, 2006: Priming biotic factors for optimal PLB and callus induction in hybrid *Cymbidium*, and assessment of cytogenetic stability in regenerated plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 84: 135-144.
6. **Murashige T., Skoog R.**, 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 431-497.
7. **Paek K. Y., Chakrabarty D., Hahn E. J.**, 2005: Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81: 287-300.
8. **Park S. Y., Yeung E. C., Chakrabarty D.**, 2002: An efficient direct induction of PLB from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. *Plant Cell Report*, 21: 46-51.
9. **Roy J., Naha S., Majumdar M., Banerjee N.**, 2007: Direct and callus-mediated protocorm-like body induction from shoot-tips of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. (Orchidaceae). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 90: 31-39.
10. **Zhao**, [Phhttp://www.bioone.org/doi/abs/10.1007/s11627-007-9101-2](http://www.bioone.org/doi/abs/10.1007/s11627-007-9101-2) - aff1, Wu [Fhttp://www.bioone.org/doi/abs/10.1007/s11627-007-9101-2](http://www.bioone.org/doi/abs/10.1007/s11627-007-9101-2) - aff1, Feng FS <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1007/s11627-007-9101-2> - aff1, Wan-Jun Wang WJ (2008). Protocorm-like body (PLB) formation and plant regeneration from the callus culture of *Dendrobium candidum* Wall *ex* Lindl. In *Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 44(3): 178-185.

MICROPROPAGATION OF *DENDROBIUM* SP. VIA SOMATIC EMBRYOGENESIS CULTURE

NGUYEN THI NGOC TU, BUI THI TUONG THU, TRAN VAN MINH

SUMMARY

Protocorm like bodies were used as planting materials. PLBs were cut into slices and placed on the medium for callus initiated. Callus was initiated on the medium MS + CW (30%) + 2.4D (0.5 mg/l). Callus proliferates on the medium MS + CW (10%) supplemented with NAA (0.5 mg/l) + 2.4D (0.1 mg/l). Callus was regenerated on the medium MS + (10%) supplemented with + NAA (0.1 mg/l) + BA (0.1 mg/l). Somatic cell suspension was initiated on MS + 2.4D (0.5 mg/l) and proliferated on the medium MS + CW (10%) supplemented was NAA (0.5 mg/l) + 2.4D (0.1 mg/l). Somatic cell suspension was differentiated to embryogenic cell suspension on the medium MS + CW (10%) supplemented with NAA (0.1 mg/l) + BA (0.1 mg/l). Embryogenic cell suspension was plating and regeneration on the medium MS + CW (10%) + NAA (0.1 mg/l) + BA (0.1 mg/l).

Ngày nhận bài: 2-8-2010