

VI NHÂN GIỐNG HỒNG MÔN (*ANTHURIUM ANDRAEANUM*) QUA NUÔI CÂY LỚP MỎNG TẾ BÀO

Trần Thị Ngọc Lan[✉], Trần Thị Hoàn Anh

Trường Cao đẳng Kinh tế Kỹ thuật Lâm Đồng

[✉]Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: tranngooclan_dl@yahoo.com.vn

Ngày nhận bài: 25.4.2016

Ngày nhận đăng: 20.4.2017

TÓM TẮT

Hồng môn (*Anthurium*) thuộc họ Araceae, là loại hoa cắt cành có giá trị kinh tế cao. Quy trình nhân giống hoa hồng môn qua nuôi cấy mô sẹo đã được thực hiện và hoàn thiện. Môi trường thích hợp cho quá trình tạo mô sẹo từ lớp mỏng mẫu lá (ITCL) là môi trường ½ MS có bổ sung 30 g/l sucrose, 1 g/l casein thủy phân (CH), 8 g/l agar, 1,5 mg/l 6-benzyladenine (BA) và 0,2 mg/l 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (tỷ lệ tạo mô sẹo đạt 77,33%). Môi trường thích hợp để tăng sinh mô sẹo là ½ MS có bổ sung 30 g/l sucrose, 1,5 mg/l BA, 1 g/l CH, 8 g/l agar (đạt tỷ lệ tăng trưởng: 21,45 lần sau 60 ngày nuôi cấy). Khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo và nhân chồi *in vitro* tốt nhất cũng trên môi trường này với 18,54 chồi/mẫu mô sẹo. Môi trường ½ MS có bổ sung 20 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính (AC) và 8 g/l agar kích thích ra rễ các chồi cây Hồng môn. Giá thể phù hợp để trồng cây con Hồng môn *in vitro* trong giai đoạn *ex vitro* là tro trấu hun và dớn với tỷ lệ 1:1 sau 30 ngày nuôi trồng trong vườn ươm (tỷ lệ sống sót đạt 100%) và không có các sai hình nào được ghi nhận từ những cây này. Quan sát mô học khối mô sẹo cho thấy có nhiều tế bào có tiềm năng phát sinh phôi, thể hiện sự tăng trưởng nhanh của mô sẹo. Đây là phương thức nhân giống và bảo quản hữu hiệu loài cây có giá trị này.

Từ khóa: 2,4-D, BA, casein thủy phân, chồi, hồng môn, ITCL, mô sẹo

ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi Hồng môn (*Anthurium*) với hơn 1500 loài là chi thuộc cây cỏ lâu năm có giá trị kinh tế cao trong lĩnh vực hoa chậu và hoa cắt cành. Cây có thể cho hoa quanh năm với hoa bền, đẹp, nhiều màu sắc rực rỡ. Ngoài ra, cây chịu bóng râm nên rất thích hợp cho trang trí trong phòng và sân vườn nơi có cường độ ánh sáng thấp. Trên thế giới, nhân giống Hồng môn *in vitro* đã được thực hiện như phương pháp nhân giống thông qua tạo mô sẹo từ hạt (Pierik *et al.*, 1974), phương pháp nuôi cấy chồi (Kunisaki, 1980), nghiên cứu tạo chồi nách và chồi bất định (Geier, 1987), tạo phôi vô tính (Đoàn Duy Thanh *et al.*, 2003), tái sinh cây *Anthurium* sp. thông qua tạo mô sẹo từ lá (Nguyễn Thị Lý Anh *et al.*, 2005; Nhut *et al.*, 2006). Geier (1986) đã phân tích ảnh hưởng của NH_4NO_3 lên sự hình thành mô sẹo và chồi từ các mô lá. Nhut *et al.*, (2006) đã báo cáo về các kiểu gen của 10 giống Hồng môn có sự đáp ứng khác nhau trong việc hình thành mô sẹo và tái sinh chồi. Chesha và đồng tác giả (2015) đã tổng kết các công trình khoa học về vi nhân giống Hồng môn nhưng

chưa có các khảo cứu về nuôi cấy lớp mỏng tế bào. Trong vi nhân giống, phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào (thin cell layer – TCL) là kỹ thuật cho phép kiểm soát điều kiện nuôi cấy do nồng độ hormone nội sinh của mẫu thấp. Sự phân cực của các tế bào trong lớp mỏng tế bào giảm, tạo được nhiều chồi hơn, do đó hệ số nhân chồi cao, có mức độ biến dị thấp và tạo điều kiện nhân nhanh các giống cây trồng. Những nghiên cứu nhân giống cây Hồng môn ở nước ta bằng phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào còn rất hạn chế. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu quy trình vi nhân giống cây Hồng môn (*Anthurium andraeanum*) là loại cây cho hoa bền và đẹp bằng phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào nhằm thiết lập quy trình vi nhân giống cây Hồng môn để đáp ứng nhu cầu sản xuất. Bên cạnh đó, các quan sát mô học về sự phát sinh mô sẹo và chồi cây trên đối tượng này cũng được tiến hành khảo sát.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng và vật liệu

Đối tượng nghiên cứu: Cây Hồng môn *A.*

andraeanum giống Tropical, 2 năm tuổi đang trong thời kỳ ra hoa, được trồng trong vườn ươm của trường Cao đẳng Kinh tế Kỹ thuật Lâm Đồng (Hình 1A).

Vật liệu sử dụng là các lá non màu nâu (có chiều dài bằng 2/3 lá trưởng thành, lấy từ cặp lá thứ 2 tính từ ngọn cây xuống) (Hình 1B). Các mẫu lá này được rửa với nước rửa chén Sunlight, khử trùng trong ethanol 70% (v/v) trong 30 giây, rửa nước đã hấp khử trùng, rồi được ngâm trong dung dịch $HgCl_2$ 0,1% trong 6 phút, rửa sạch 5 lần bằng nước đã hấp khử trùng.

Môi trường cơ bản nuôi cấy *in vitro*: môi trường ½ MS (Murashige, Skoog, 1962) (ngoại trừ thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của các loại môi trường nuôi cấy). pH môi trường nuôi cấy: 5,7.

Phương pháp

Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D và BA lên khả năng hình thành mô sẹo từ lá

Mẫu lá non được cắt thành lớp mỏng theo chiều dọc (longitudinal thin cell layer -ITCL) kích thước 2 mm x 2 mm, được nuôi cấy trên môi trường ½ MS, 8 g/l agar, 30 g/l sucrose, 1 g/l CH với việc bổ sung hay không bổ sung 2,4-D (các nồng độ 0, 0,1, 0,2, 0,3 mg/l) và BA (các nồng độ 0, 1,5 mg/l) vào môi trường nuôi cấy (gồm 7 nghiệm thức). Nuôi cấy 2 mẫu/bình có thể tích 250 ml chứa 40 ml môi trường nuôi cấy, mỗi nghiệm thức 10 bình. Xác định tỷ lệ sống sót và tỷ lệ hình thành mô sẹo của những mẫu này sau 60 ngày nuôi cấy.

Khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên khả năng hình thành mô sẹo từ lá

Các ITCL của mẫu lá non có kích thước 2 mm x 2 mm được nuôi cấy trên ba loại môi trường: MS, ½ MS và MS giảm ½ khoáng đa lượng ngoại trừ $MgSO_4$ và $CaCl_2$ (MS1) bổ sung 1 g/l CH, 0,2 mg/l 2,4-D, 1,5 mg/l BA, 30 g/l sucrose và 8 g/l agar. Nuôi cấy 2 mẫu/bình có thể tích 250 ml chứa 40 ml môi trường nuôi cấy, mỗi nghiệm thức 10 bình. Xác định tỷ lệ sống sót và tỷ lệ hình thành mô sẹo của những mẫu này sau 60 ngày nuôi cấy.

Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D và BA lên khả năng tăng trưởng và hình thành chồi của mô sẹo

Mẫu mô sẹo hình thành có khối lượng 100 mg, được cấy chuyển trên môi trường ½ MS, 8 g/l agar, 30 g/l sucrose, 1 g/l CH, có bổ sung 0 và 0,1 mg/l 2,4-D riêng lẻ hay kết hợp với 1,5 mg/l BA. Các mẫu được nuôi cấy trong 30 ngày với 10 mẫu/bình có thể tích 500 ml chứa 70 ml môi trường nuôi cấy, mỗi

nghiệm thức 5 bình. Xác định tỷ lệ hình thành và tăng trưởng của mô sẹo (tỷ số giữa khối lượng mô sẹo sau và trước nuôi cấy), tỷ lệ hình thành chồi và số chồi hình thành/mẫu mô sẹo. Sau đó, các chồi hình thành từ mô sẹo được chuyển sang môi trường ½ MS bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar và nuôi cấy thêm 30 ngày để các chồi phát triển. Số liệu được thu nhận sau 30 ngày nuôi cấy.

Khảo sát ảnh hưởng của α -NAA và than hoạt tính đến khả năng ra rễ, tạo cây hồng môn hoàn chỉnh

Các chồi đạt tiêu chuẩn từ thí nghiệm trên (chồi cao trên 2,5 cm có một cặp lá trở lên) được nuôi cấy trên môi trường ½ MS + 20g/lit sucrose, 8g/lit agar, có bổ sung hay không bổ sung 0,5 mg/l α -NAA và 1 g/l than hoạt tính. Nuôi cấy 10 chồi/bình có thể tích 500 ml chứa 70 ml môi trường nuôi cấy. Mỗi nghiệm thức 5 bình. Số liệu được thu nhận sau 30 ngày nuôi cấy.

Khảo sát ảnh hưởng của giá thể lên khả năng thích nghi khi nuôi trồng cây con trong vườn ươm

Cây con đạt tiêu chuẩn (cao \geq 4 cm, có hai cặp lá trở lên) được lấy ra khỏi bình, trồng trên một trong các loại giá thể (dớn sợi, tro trấu hun hay hỗn hợp dớn sợi và tro trấu hun với tỷ lệ 1:1, tất cả được xử lý có pH từ 6 – 7). Thí nghiệm được bố trí theo chế độ chăm sóc trong điều kiện vườn ươm được che lưới giảm nắng 70%, tránh nắng mưa trực tiếp, giữ ẩm thường xuyên bằng cách tưới phun sương 2 lần/ngày. Sau khi trồng cây được 20 ngày, cây ra rễ mới sẽ được phun phân N-P-K 8-4-11 (2 g/l nước) định kỳ mỗi tuần một lần và nuôi trồng trong điều kiện bình thường của vườn ươm có độ che nắng 50%. Theo dõi các chỉ tiêu: tỷ lệ sống sót, tỷ lệ ra rễ mới, số lá/cây và ghi nhận số liệu sau 30 ngày nuôi trồng.

Quan sát mô học

Làm các loại tiêu bản về mô sẹo với việc cắt lát theo chiều dọc mẫu mô sẹo cần quan sát, ngâm trong dung dịch javel 10% trong 15 phút, rửa nước, ngâm trong dung dịch acid acetic 45% trong 15 phút, rửa nước, nhuộm màu bằng thuốc nhuộm hai màu carmin và xanh iod trong 15 phút, rửa nước và quan sát trên kính hiển vi quang học Olympus, Nhật với độ phóng đại 40 - 400 lần. Xác định kích thước bằng thước đo mm và trắc vi thị kính.

Điều kiện thí nghiệm

Tất cả các thí nghiệm nhân giống *in vitro* và *ex vitro* được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, lặp lại ba lần. Nhiệt độ phòng nuôi là $25 \pm 1^\circ C$, cường độ ánh sáng: 2000 lux và độ ẩm không khí: 70%. Chu kỳ chiếu

sáng trong ngày: 16 giờ sáng và 8 giờ tối. Trong thí nghiệm khảo sát sự thích nghi của cây con trong điều kiện *ex vitro* thì sử dụng vườn ươm có lưới che 50% ánh sáng, có nhiệt độ dao động ngày đêm là 17 – 25 ±1°C, cường độ ánh sáng: 7000 lux và độ ẩm không khí: 80%.

Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Các số liệu thu được là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Số liệu thu thập được xử lý trên phần mềm Excel 2010 và được phân tích thống kê bằng phép thử Duncan (sự khác biệt có ý nghĩa ở mức xác suất $P < 0,05$) với phần mềm xử lý thống kê SPSS (Statistical Program Scientific System) 16.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của 2,4-D và BA lên sự phát sinh mô sẹo từ lát cắt lá non cây Hồng môn

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy, sau 60 ngày nuôi cấy, tỷ lệ mẫu sống đạt 50,67% - 96,33% ở các nghiệm thức có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật (CĐHSTTV). Điều này cho thấy vai trò của CĐHSTTV trong sự duy trì sự sống sót của mẫu cấy. Các mẫu sống sót có lá xanh, vài mẫu lá phồng lên. Sự sống sót của mẫu cấy tạo điều kiện cho sự cảm ứng và phân chia tế bào của chúng. Tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo đạt cao nhất ở nghiệm thức môi trường ½ MS có bổ sung 0,2 mg/l 2,4-D và 1,5 mg/l BA (77,33%). Trên môi trường ½ MS không bổ sung CĐHSTTV thì không hình thành mô sẹo. Trên môi trường chỉ bổ sung 2,4-D, tỷ lệ hình thành mô sẹo thấp (0 – 15%). Điều này chứng tỏ là sự kết hợp giữa 2,4 - D và BA ở các nồng độ khác nhau đều có hiệu quả kích thích sự hình thành mô sẹo.

Mô sẹo được tạo ra có màu vàng nhạt hơi sáng, dạng hạt nhỏ, xốp mềm, nằm ở rìa mảnh lá tại vị trí các vết cắt, sau đó phồng to, phát triển tiếp tục trên toàn bộ mẫu lá (Hình 1C). Sự hình thành mô sẹo là phản ứng tăng sinh hỗn loạn của mô bị thương trong điều kiện có tác nhân kích thích giúp hình thành mô sẹo trước khi phát triển và phân hóa.

Trong thí nghiệm này, phần lớn các mô sẹo hình thành được tạo ra nhiều nhất trên các môi trường có bổ sung 2,4-D và BA. Theo George (2008), cytokinin kích thích sự phân chia tế bào với điều kiện có auxin. Các ITCL của mẫu lá non đã có sẵn auxin nội sinh. Khi nuôi cấy các mẫu lá này trên môi trường có BA, cytokinin ngoại sinh này sẽ kết hợp với 2,4-D và

auxin nội sinh trong phần non của mẫu cấy, kích thích tế bào mô lá phân chia tạo mô sẹo.

Nuôi cấy lớp mỏng tế bào là phương pháp hữu hiệu trong cảm ứng mô sẹo do các ITCL với kích thước mỏng sẽ tạo ưu thế cho việc cảm ứng của CĐHSTTV lên mẫu cấy dễ dàng hơn so với những mẫu cây dày. Đặc tính mỏng của mẫu cấy đóng vai trò quan trọng trong quá trình đáp ứng với các tác nhân ngoại sinh như CĐHSTTV, chất dinh dưỡng... do các yếu tố nội sinh thường ảnh hưởng không lớn trong hệ thống TCL (Teixeira da Silva, Tanaka, 2006). Dương Tấn Nhựt *et al.*, (2004) đã sử dụng 1 mg/l 2,4-D và 1,5 mg/l BA để hình thành mô sẹo từ lá *Anthurium* “Sonate” với mẫu lát cắt lá có diện tích 1,5 cm². Farsi *et al.*, (2012) đã cảm ứng mô sẹo từ lá *Anthurium andreanum* cv. Terra có tỷ lệ đạt mô sẹo cao nhất (80%) khi bổ sung 0,1 mg/l 2,4-D và 1,5 mg/l BA. Trong nghiên cứu này, chỉ cần nồng độ 0,2 mg/l 2,4-D và 1,5 mg/l BA là đủ cảm ứng hình thành mô sẹo từ các ITCL của lá. Điều này nói lên đặc tính dễ nhạy cảm với CĐHSTTV của các TCL.

Việc sử dụng casein thủy phân có tác dụng bổ sung nguồn đạm dễ tiêu là các acid amin, giúp các tế bào đủ dinh dưỡng để mẫu cấy có thể gia tăng quá trình phân bào, hình thành mô sẹo. Một số nghiên cứu về Hồng môn ở giai đoạn khởi đầu cũng đã sử dụng casein thủy phân trong nuôi cấy (Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2004) hay nghiên cứu tạo mô sẹo ở Địa lan *Cymbidium* (Huan *et al.*, 2004) cũng đã khẳng định vai trò của hợp chất này trong việc hỗ trợ quá trình hình thành và tăng sinh của mô sẹo.

Như vậy, môi trường ½ MS bổ sung 1 g/l CH, 0,2 mg/l 2,4-D, 1,5 mg/l BA, 30 g/l sucrose và 8 g/l agar được chọn để nuôi cấy hình thành mô sẹo từ các ITCL của lá Hồng môn.

Bảng 1. Ảnh hưởng của CĐHSTTV lên khả năng sống sót và hình thành mô sẹo từ các lát cắt từ lá cây Hồng môn sau 60 ngày nuôi cấy.*: Các mẫu tự khác nhau (a,b,...) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với $P < 0,05$ bằng phép thử Duncan.

Nồng độ 2,4-D (mg/l)	Nồng độ BA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu sống sót (%)	Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)
0	0	0,00f*	0,00e
0,1	0	50,33e	0,00e
0,1	1,5	76,67b	54,33b
0,2	0	60,33d	12,67d
0,2	1,5	86,33a	77,33a
0,3	0	52,67e	15,00d
0,3	1,5	68,67c	40,67c

Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên khả năng hình thành mô sẹo từ lá

Đối với Hồng môn, các chất trong môi trường nuôi cấy ảnh hưởng rất lớn đến quá trình sống sót và hình thành mô sẹo của mẫu. Các số liệu thu nhận được thể hiện qua Bảng 2.

Tỷ lệ sống sót cũng như tỷ lệ hình thành mô sẹo đạt cao hơn cả trên các môi trường ½ MS và MS1 trong ứng lần lượt (88,67% và 76,33%; 89,33 và 77%). Các công trình nghiên cứu của Nhut *et al.*, (2006), Farsi *et al.*, (2012) đều sử dụng môi trường MS1 trong nuôi cấy Hồng môn. Điều này cho thấy, các chất khoáng, đặc biệt là khoáng đa lượng (như KNO₃, NH₄NO₃, KH₂PO₄) cao không thích hợp cho sự sống sót và phát triển của mẫu lá Hồng môn. Ở đây, chúng tôi chọn môi trường ½ MS vừa có thể tiết kiệm hóa chất mà vẫn đạt được kết quả hình thành mô sẹo một cách khả quan. Vì vậy, môi trường ½

MS được chọn trong nuôi cấy mô sẹo và vi nhân giống Hồng môn.

Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên khả năng hình thành mô sẹo từ lá sau 60 ngày nuôi cấy.*: Các mẫu tự khác nhau (a,b,...) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với P <0,05 bằng phép thử Duncan.

Loại môi trường nuôi cấy	Tỷ lệ sống sót (%)	Tỷ lệ hình thành mô sẹo (%)
MS	34,33b*	34,33b
½ MS	88,67a	76,33a
MS1	89,33a	75,00a

Ảnh hưởng của nồng độ BA và 2,4-D lên khả năng tăng trưởng mô sẹo và hình thành chồi cây Hồng môn

Tiến hành khảo sát về khả năng tăng trưởng và biệt hóa thành chồi của mô sẹo dưới tác dụng của 2,4-D và BA với kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của 2,4-D và BA lên khả năng tăng trưởng mô sẹo và hình thành chồi cây Hồng môn sau 30 ngày nuôi cấy.*: Các mẫu tự khác nhau (a,b,...) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với P <0,05 bằng phép thử Duncan.

Nồng độ BA (mg/l)	Nồng độ 2,4-D (mg/l)	Tỷ lệ tái sinh mô sẹo (%)	Tỷ lệ tăng trưởng của mô sẹo	Tỷ lệ hình thành chồi (%)	Số chồi/mẫu
0	0	16,33c*	2,45c	83,67a	12,50b
1,5	0	58,67b	21,45a	41,33b	18,54a
1,5	0,1	75,67a	17,16b	24,33c	6,85c

Tác dụng của 2,4-D mặc dù ở nồng độ tương đối thấp đã duy trì tiềm năng tăng trưởng của mô sẹo. Cụ thể, tại nghiệm thức bổ sung 0,1 mg/l 2,4-D và 1,5 mg/l BA, cho tỷ lệ tái sinh mô sẹo là cao hơn cả (75,67%). Sự kết hợp giữa auxin ở nồng độ thấp và cytokinin ở nồng độ cao sẽ giúp ích cho sự duy trì của mô sẹo (Bùi Trang Việt, 2002). Điều đáng chú ý là tại nghiệm thức chỉ bổ sung 1,5 mg/l BA thì tỷ lệ hình thành mô sẹo có thấp hơn (58,67%) nhưng số mô sẹo này lại cho tỷ lệ tăng trưởng cao hơn cả (gấp 21,45 lần so với mẫu mô sẹo ban đầu, hình 1D) và 41,33% số mô sẹo tại nghiệm thức này biệt hóa thành chồi với số chồi hình thành cũng cao hơn cả (18,54 chồi/mẫu mô sẹo). Gaspar *et al.*, (2003) cho rằng, các thí nghiệm tạo chồi bất định thường cho kết quả cao khi sử dụng nồng độ cytokinin cao và nồng độ auxin thấp. Theo George (1993), cytokinin có vai trò trong việc kích thích sự xuất hiện chồi và kéo dài chồi. Điều này phù hợp với kết quả thí nghiệm, khi nuôi cấy mô sẹo trong môi trường có BA thì cytokinin ngoại sinh này sẽ kích thích phân chia tế bào, giúp chồi phát triển. Fersing & Lutz (1977) nhận thấy,

giống Hồng môn *Anthurium scherzerianum* và *Anthurium andreaeanum* cho nhiều chồi trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* trên môi trường có chứa BA và 2,4-D. Geier (1986) đã sử dụng 2,4-D và BA để tạo chồi ở *A. scherzerianum* hay Cimen & Ozge (2009) nghiên cứu tái sinh chồi hai giống Hồng môn Arizona và Sumi trên môi trường ½ MS bổ sung 0,1 mg/l 2,4-D và 1 mg/l BA. Kết quả của chúng tôi trên giống Tropical cho thấy, chỉ cần bổ sung 1,5 mg/l BA là đủ để hình thành chồi từ mô sẹo (Hình 1F). Có lẽ, một lượng auxin đã tích lũy trong mẫu mô sẹo trước đó vẫn duy trì tiềm năng và cùng phối hợp với BA làm phát sinh chồi từ mô sẹo. Sự tăng trưởng mô sẹo và hình thành chồi từ nghiệm thức này đã duy trì trong suốt 2 năm nuôi cấy để nhân giống Hồng môn và đến nay các quá trình này vẫn được duy trì. Vì vậy, môi trường ½ MS bổ sung 30 g/l sucrose, 1,5 mg/l BA, 1 g/l CH và 8 g/l agar được sử dụng để tăng sinh mô sẹo và hình thành chồi từ mô sẹo.

Khi chuyển các mô sẹo đã hình thành chồi sang môi trường ½ MS bổ sung 30 g/l sucrose và 8 g/l

agar thì các chồi sinh trưởng, gia tăng chiều cao, phát triển lá sau 30 ngày nuôi cấy tiếp theo. Các chồi có chiều dài trung bình trên 2,5 cm với một cặp lá trở lên (Hình 1H).

Ảnh hưởng của α -NAA và than hoạt tính lên khả năng ra rễ từ chồi cây Hồng môn

Sau 30 ngày nuôi cấy chồi Hồng môn, các dữ liệu ở Bảng 4 cho thấy tỷ lệ hình thành rễ đạt cao nhất (100%) ở các nghiệm thức bổ sung 1 g/l AC đơn lẻ hay kết hợp với 0,5 mg/l α -NAA.

Các công trình của Cimen và Ozge (2009) đã sử dụng 1 mg/l IBA và 0,04% AC để giúp chồi của hai giống Hồng môn Arizona và Sumi tạo rễ

hay Joseph và Martin (2003) đã sử dụng 0,1 mg/ α -NAA để tái sinh rễ giống Hồng môn *A. andreanum* Hort. Dương Tấn Nhựt *et al.*, (2004) đã sử dụng 0,5 mg/l α -NAA và 1 g/l AC để kích thích ra rễ Hồng môn. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi trên giống Hồng môn Tropical cho thấy, không cần sử dụng CĐHSTTV mà chỉ cần bổ sung 1 g/l than hoạt tính là đủ để giúp chồi cây Hồng môn ra rễ (Hình 1I). Kết quả này cũng khá tương đồng với nghiên cứu của Farsi *et al.*, (2012) trên đối tượng *A. andreanum* cv. Terra. Như vậy, khả năng ra rễ của chồi Hồng môn có thể không cần CĐHSTTV mà thực tế chồi cây có đủ độ trưởng thành để đi đến giai đoạn ra rễ hay không.

Bảng 4. Ảnh hưởng của α -NAA và than hoạt tính lên khả năng tăng trưởng chồi và ra rễ từ chồi cây Hồng môn sau 30 ngày nuôi cấy. *: Các mẫu tự khác nhau (a,b,...) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với P <0,05 bằng phép thử Duncan.

Nồng độ α -NAA (mg/l)	Nồng độ AC (g/l)	Tỷ lệ hình thành rễ (%)	Số rễ/cây	Chiều cao cây (cm)
0	0	40,33	2,23b	2,95b
0	1	100	4,94a	4,49a
0,5	0	100	5,12a	4,52a
0,5	1	100	5,21a	4,71a

Ảnh hưởng của loại giá thể lên khả năng thích nghi khi nuôi trồng cây con trong vườn ươm

Sau 30 ngày nuôi trồng các cây con trong vườn ươm cho thấy chúng đều có sự thích ứng với điều kiện *ex vitro*, rễ mới xuất hiện ở tất cả các nghiệm thức (Hình 2A). Tỷ lệ sống sót và ra rễ mới đạt cao nhất ở nghiệm thức trồng cây với giá thể hỗn hợp tro trấu hun và dớn theo tỷ lệ 1:1 (đạt 100%, bảng 5, Hình 2B). Điều này có thể được

giải thích ở chỗ dớn có khả năng giữ ẩm, tro trấu lại thông thoáng. Hơn nữa, nếu chỉ sử dụng dớn sợi sẽ có giá thành giá thể cao. Vì vậy, hỗn hợp tro trấu hun và dớn là giá thể thích hợp trong ươm trồng cây con Hồng môn.

Cho đến nay, chúng tôi đã cung cấp hơn 5000 cây con Hồng môn đạt chất lượng cho bà con nông dân nuôi trồng và tỷ lệ sống sót và phát triển của những cây này hầu như đạt 100%.

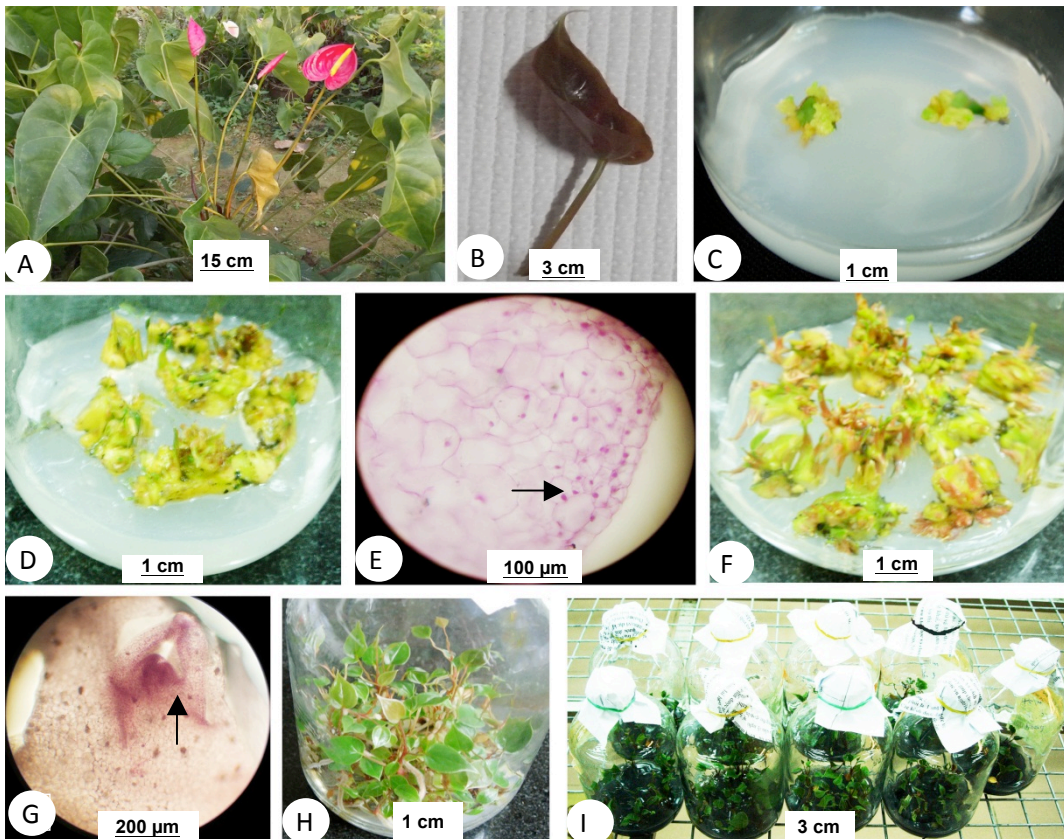
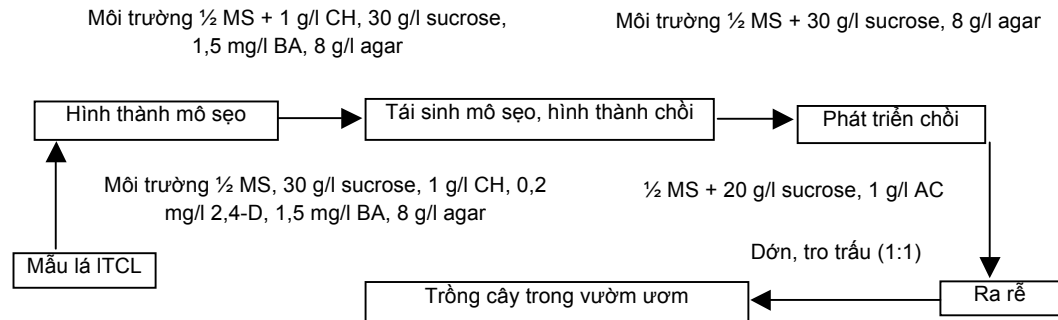
Bảng 5. Ảnh hưởng của loại giá thể lên khả năng thích nghi của cây con Hồng môn trong vườn ươm sau 30 ngày nuôi trồng. *: Các mẫu tự khác nhau (a,b,...) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với P <0,05 bằng phép thử Duncan.

Loại giá thể	Tỷ lệ sống sót (%)	Tỷ lệ ra rễ mới (%)	Số lá /cây
Dớn sợi	81,67b*	81,67b	5,67a
Tro trấu	67,33c	67,33c	2,89b
Dớn sợi + tro trấu (1:1)	100,00a	100,00a	5,51a

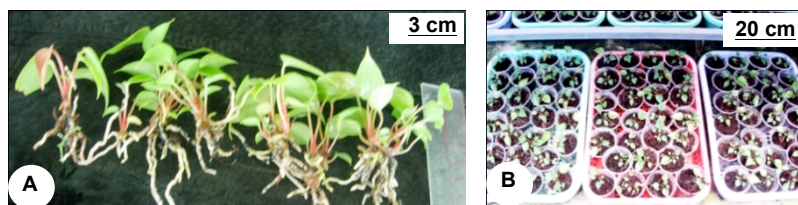
Quan sát mô học

Làm tiêu bản các mẫu mô sẹo và quan sát dưới kính hiển vi quang học cho thấy có sự phân chia vô tổ chức của các tế bào mô sẹo. Trong đó, có nhiều tế bào đẳng kính, nhân to vách mỏng, là những tế

bào có tiềm năng phát sinh phôi (Hình 1E). Từ điều này cho thấy sự tăng trưởng nhanh của mô sẹo. Vài vùng mô sẹo biệt hóa thành chồi với mô phân sinh và sơ khởi lá (Hình 1G) để từ đó hình thành cây con trong quá trình nhân giống Hồng môn.



Hình 1.Vi nhân giống cây Hồng môn (*Anthurium andraeanum*).A. Cây Hồng môn (*Anthurium andraeanum*). B. Lá non của cây Hồng môn được sử dụng làm mẫu cấy. C. Mô sẹo hình thành từ các ITCL của lá Hồng môn sau 60 ngày nuôi cấy. D. Sự tăng sinh của khối mô sẹo sau 30 ngày nuôi cấy. E. Sự phân chia tế bào của mô sẹo sau 30 ngày nuôi cấy. F. Sự hình thành chồi từ mô sẹo sau 30 ngày nuôi cấy. G. Chồi cây Hồng môn với mô phân sinh ngọn và sơ khởi lá trên khối mô sẹo. H. Cây con hình thành từ khối mô sẹo. I. Nhân giống ra rễ cây Hồng môn.



Hình 2. A. Sự thích nghi và phát triển của cây con Hồng môn trong vườn ươm. A. Sự ra rễ mới và phát triển lá của các cây Hồng môn sau 30 ngày nuôi trồng. B. Cây con Hồng môn trồng trên giá thể dớn và trấu hun.

KẾT LUẬN

Môi trường thích hợp để hình thành mô sẹo từ các ITCL mẫu lá Hồng môn là ½ MS bổ sung 1 g/l CH, 30 g/l sucrose, 0,2 mg/l 2,4-D, 1,5 mg/l BA và 8 g/l agar. Mô sẹo tăng sinh và hình thành chồi tốt nhất trên môi trường ½ MS bổ sung 1 g/l CH, 30 g/l sucrose, 0,2 mg/l 2,4-D, 1,5 mg/l BA và 8 g/l agar. Sự ra rễ cây Hồng môn trên môi trường ½ MS không cần bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật và giá thể phù hợp trong nuôi trồng Hồng môn *ex vitro* là dớn và tro trấu hun theo tỷ lệ 1:1.

Chúng tôi xin đưa ra quy trình nhân giống Hồng môn *Anthurium andraeanum*, giống Tropical như sau:

Lời cảm ơn: Các tác giả trân trọng cảm ơn Trường Cao đẳng Kinh tế Kỹ thuật Lâm Đồng đã giúp đỡ, hỗ trợ trong nghiên cứu đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Thị Lý Anh, Nguyễn Thị Hương, Nguyễn Thị Thanh Phương (2005) Nhân nhanh giống hoa hồng môn nhập nội bằng phương pháp nuôi cấy mô. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp* 1: 38-43.

Chesha Desai, Rajashekhar Inghalihalli, R. Krishnamurthy (2015) Micropropagation of *Anthurium andraeanum*-An important tool in floriculture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 4(3): 112-117.

Cimen A, Ozge C (2009) Micropropagation of *Anthurium andraeanum* from leaf explants. *Pak J Bot* 41(3): 1155-1161.

Farsi M, Taghavizadeh Yazdi ME, Qasemiomran V (2012) Micropropagation of *Anthurium andraeanum* cv. Terra. *African J Biotech* 11(68): 13162-13166.

Fersing G, Lutz A (1977) Etude comparative de la multiplication végétale *in vitro* de deux espèces horticoles d'*Anthurium*: *A. andraeanum* et *A. scherzerianum*. *CR Acad Sci Paris* 284: 2231-2233.

Gaspar T, Kevers C, Faivre Rampant O, Crèvecoeur M, Penel CI, Gerppin H, Dommes J (2003) Changing concept in plant hormone action. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 39(2): 85-106.

Geier T (1986) Factor affecting plant regeneration from leaf segments of *Anthurium scherzerianum* Schott cultured *in vitro*. *Plant cell Tiss Org Cult* 6: 115-125.

Geier T (1987) Micropropagation of *Anthurium scherzerianum*: propagation schemes and plant conformity. *Acta Hort* 212(2): 439-443.

George EF (1993) Plant propagation by tissue culture. Part 1: The technology (316-318). England: Exegetics Ltd.

George EF, Hall MA, Klerk JD (2008) Plant propagation by tissue culture, Volume 1. The Background, Springer: 65-75.

Huan LVT, Takamura T, Tanaka M (2004) Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Science* 166:1443-1449.

Joseph D, Martin KP, Madassery J, Philip VJ (2003) *In vitro* propagation of three commercial cut flower cultivars of *Anthurium andraeanum* Hort. *Indian J Exp Biol* 41(2):154-159.

Kunisaki J T (1980) *In vitro* propagation of *Anthurium andraeanum* Lind. *Hort Sci* 15: 508-509.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473- 497.

Dương Tấn Nhứt, Đinh Văn Khiêm, Nguyễn Thị Thanh Hằng, Hà Thị Thuý, Đỗ Năng Vịnh (2004) Sự tái sinh chồi từ callus, sự tạo cây từ hạt và ứng dụng của nó trong việc nhân nhanh giống hoa Hồng môn (*Anthurium* sp.). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 42(3): 32-36.

Nhut, DT, Duy N, Vy NNH, Khue CD, Khiem DV, Vinh DN (2006) Impact of *Anthurium* spp. Genotype on callus induction derived from leaf explants, shoot and root regeneration capacity from callus. *J Applied Hort* 8(2): 135-137.

Pierik R L M, Steegmans H H M, Van der M J A J (1974) Plantlet formation in callus tissue of *Anthurium andraeanum* Lind. *Sci Hort* 2: 193-198.

Teixeira da Silva JA, Tanaka M (2006) Multiple Regeneration Pathways via thin cell layers in Hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae). *J Plant Growth Regul* 25(3): 203-210.

Đoàn Duy Thanh, Nguyễn Huy Thuận, Đỗ Thanh Toàn, Đỗ Năng Vịnh (2003) Một số kết quả nghiên cứu tạo phôi vô tính ở cây Hồng môn (*Anthurium andraeanum*). Báo cáo khoa học Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc: 967-970. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.

Bùi Trang Việt (2002) *Sinh lý thực vật đại cương*, tập 2. NXB Đại học Quốc Gia TP. Hồ Chí Minh.

IN VITRO MICROPROPAGATION OF *ANTHURIUM ANDRAEANUM* THROUGH THIN CELL LAYER CULTURE

Trần Thị Ngọc Lan, Trần Thị Hoàn Anh

Technical and Economic College of Lam Dong

SUMMARY

Anthurium is a kind of major cut flower species and economically important genera in the family Araceae. A regeneration system of *Anthurium andraeanum* from callus culture is studied along with improving propagation process. Optimal medium for callus formation from the longitudinal thin cell layer leaf culture was ½ MS (Murashige, Skoog, 1962) supplemented with 30 g/l sucrose, 1 g/l casein hydrolysate (CH), 8 g/l agar, 1.5 mg/l BA and 0.2 mg/l 2,4-D (the induction callus rate of 77.33%). Calli multiplied with 21.45-fold fresh mass increase when they were subcultured once 60 days on the ½ MS supplemented with 1 g/l CH, 30 g/l sucrose, 1.5 mg/l BA and 8 g/l agar. The highest ratio of shoot induced from callus culture was also on this medium (18.54 shoots per explants). The medium ½ MS supplemented with 20 g/l sucrose, 1 g/l AC, 8 g/l agar and without plant growth regulators is the most suitable one for root formation of these multiple-shoots. The highest survival rate is observed with substrate mixture of fern moss and rice husk ash in the ratio of 1:1 (gave the best regeneration rate of 100% in the *ex vitro* culture) and no morphological variations were observed in these plantlets after about thirty days, acclimatized in the greenhouse. Histological observation showed that these calli contained embryogenic cells with their fast growth. It could be an alternative tool for propagation and preservation of *Anthurium andraeanum*, a valuable cultivar.

Keywords: 2,4-D, *Anthurium*, BA, callus, casein hydrolysate, ITCL, shoots