

## TÁI SINH VÀ BẢO QUẢN HẠT NHÂN TẠO CỦA CÂY LAN HỒ ĐIỆP (*PHALAEENOPSIS AMABILIS*)

Dương Tấn Nhựt<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Kim Tuyền<sup>1</sup>, Nguyễn Duy<sup>2</sup>, Mai Xuân Phán<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Phân Viện Sinh học tại Đà Lạt

<sup>2</sup>Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam

### TÓM TẮT

Phương pháp tạo hạt nhân tạo trong nhân giống thực vật đã đóng góp rất lớn cho công tác nhân và bảo quản giống cây trồng, đặc biệt là những cây lương thực và cây hoa. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày một phương pháp tạo hạt nhân tạo được áp dụng trên đối tượng cây hoa lan Hồ điệp (*Phalaenopsis amabilis*) - một loài hoa đẹp và có giá trị kinh tế cao. Nguyên liệu dùng để tạo hạt nhân tạo là mô sẹo, thể dẻ hành (protocorm-like body - PLB) và phôi vô tính của cây lan Hồ điệp *in vitro*. Nồng độ sodium alginate trong vỏ hạt khác nhau và phần nội nhũ nhân tạo được làm giàu bởi môi trường chứa Hyponex, đường, dịch chiết khoai tây và vitamin MS. Sau đó, hạt được bảo quản và nuôi cấy trên các loại môi trường cũng như các giá thể khác nhau nhằm khảo sát khả năng bảo quản và tái sinh của chúng. Kết quả cho thấy nguyên liệu để tạo hạt nhân tạo tốt nhất cho đối tượng lan Hồ điệp là phôi vô tính. Nồng độ alginate 30 g/l trong dung dịch tạo vỏ hạt nhân tạo là nồng độ tối ưu giúp hạt có tỷ lệ nảy mầm cao được ứng dụng để nhân giống *in vitro*. Môi trường tốt nhất để tái sinh hạt là môi trường chứa 3 g/l Hyponex, 5 ml/l vitamin MS, 30 g/l khoai tây nấu chín, 9 g/l agar và 1 g/l than hoạt tính; môi trường bảo quản hạt tốt nhất cho hạt nhân tạo từ PLB là môi trường chứa 1,5 g/l Hyponex bổ sung 2,5 ml/l vitamin MS và 15 g/l khoai tây nấu chín. Đối với hạt được tạo ra từ mô sẹo thì môi trường bảo quản cần thêm 15 g/l đường. Hạt nhân tạo từ PLB có khả năng sống sót cao trên môi trường bổ sung 3 g/l Hyponex, 5 ml/l vitamin MS, 30 g/l khoai tây nấu chín với giá thể bông gòn (87%), trong khi đó, hạt tạo thành từ mô sẹo lại có thể sống sót hoàn toàn khi được bảo quản bằng nước cất.

**Từ khóa:** Hạt nhân tạo, Hyponex, *Phalaenopsis amabilis*, sodium alginate, sự tái sinh, tỷ lệ sống sót

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Hầu hết các loài thực vật được nhân giống bằng hạt, hạt là cơ quan đầu tiên để bảo quản chất mầm và nhân giống ở tất cả thực vật có hoa. Như một thể nhân giống, hạt giống có thể được trồng trọt nhanh với những thiết bị cơ giới. Tuy nhiên, phương pháp nhân giống từ hạt không hiệu quả do số lượng hạt này mầm thấp, không đồng loạt và không đảm bảo về mặt di truyền. Vì vậy, nhân giống vô tính hiện được xem là một phương pháp hiệu quả để tạo ra một số lượng lớn cây giống.

Trên thực tế, ứng dụng thương mại của cây giống nuôi cấy mô bị giới hạn do chi phí cao mặc dù tạo được số lượng cây nhiều và đồng loạt. Hơn nữa, việc bảo quản và phân phối cây con gặp nhiều khó khăn do cây con có thời gian bảo quản ngắn, chiếm nhiều diện tích và dễ tổn thương trong quá trình vận chuyển. Trước tình hình đó, những nỗ lực để tìm kiếm phương pháp nhân nhanh, bảo quản giống lâu dài đã không ngừng tăng lên và một trong những

phương pháp được nghiên cứu và ứng dụng hiện nay là tạo hạt nhân tạo.

Hạt nhân tạo là một dạng hạt mô phòng hạt tự nhiên, hạt nhân tạo chứa phôi vô tính được bọc trong một lớp alginate có chứa chất dinh dưỡng, sau đó, các phôi vô tính có thể nảy mầm thành cây con hoàn chỉnh (Redenbaugh *et al.*, 1987; Saiprasad, 2001).

Tạo hạt nhân tạo được đề cập lần đầu tiên vào đầu thập niên 80 của thế kỷ trước với những nỗ lực của Walker và Sato (1981) nhằm phát triển hạt nhân tạo của cây cỏ linh lăng (*Medicago sativa* L.) và bởi Redenbaugh và đồng tác giả tiến hành trên cây cần tây và rau diếp (1987, 1991). Nhiều phương pháp tạo hạt nhân tạo khác nhau đã được thử nghiệm như công nghệ gieo lòng cà rốt (Drew, 1979), dùng polyoxyethylene làm vỏ hạt (Kitto, Janick, 1982; 1985) nhưng kết quả không khả quan.

Việc sử dụng sodium alginate làm vỏ bao bọc đã đạt được một số kết quả khả quan trên các đối tượng như: cần tây (Redenbaugh *et al.*, 1987; 1991), hoa

cẩm chương (Fukai *et al.*, 1994), *Dendrobium wardianum* (Sharma *et al.*, 1992), *Phaius tankervillae* (Malemngaba *et al.*, 1996), *Spathoglottis plicata* (Singh, 1991). Tiếp nối các nghiên cứu này, Stephen và Jayabalan (2000) đã tiến hành sản xuất hạt nhân tạo bằng alginate từ phôi sinh dưỡng trưởng thành của cây rau mùi (*Coriandrum sativum* L.), Ipekci và Gozukirmizi (2003) cũng đưa ra nghiên cứu đầu tiên về hạt nhân tạo của cây hồng (*Paulownia elongata*), cây sâm Siberia (Jung *et al.*, 2004)... Kết quả cho thấy, nồng độ alginate từ 3 - 5% là tốt nhất để làm vỏ bọc cho các đơn phôi vì tạo hạt dễ dàng cũng như việc chúng có khả năng này mầm thành cây con với đầy đủ chồi và rễ. Các cây con có nguồn gốc từ những hạt nhân tạo này có hình thái giống hệt cây *in vitro* ban đầu và phát triển bình thường trong điều kiện nhà kính.

Ngoài ra, một số nguyên liệu tạo vỏ hạt khác cũng được khảo sát như polyethyleneimine trong quy trình hai bước (Kersulec *et al.*, 1993) hay chitosan (Tay *et al.*, 1993; Nhut *et al.*, 2005) và nhiều phương thức tạo hạt khác nhau cũng được các nhà nghiên cứu so sánh như sự làm đặc từ bên ngoài vào bên trong để tạo hạt hoặc từ bên trong ra bên ngoài để tạo hạt rỗng có một lớp màng alginate bao xung quanh nhân ở dạng lỏng (Patel *et al.*, 2000).

Tại Việt Nam, năm 1992, Viện Sinh học nhiệt đới cũng đã thực hiện việc sản xuất hạt nhân tạo trên đối tượng cây cà phê. Môi trường tạo hạt là sodium alginate 4% hòa vào 100 ml môi trường MS có bổ sung nước dừa 20%, 10 mg/l BA, 0,4 mg/l IBA, 40 mg/l adenin, vitamin Morel giống như môi trường nuôi cấy phôi cà phê (Nguyễn Văn Uyển, 1992).

Dương Tấn Nhựt và đồng tác giả (2004) cũng đã tạo thành công hạt nhân tạo từ vảy củ của hoa Lily (*Lilium* spp.). Theo nghiên cứu này, nồng độ 30 g/l alginate lại thích hợp hơn cho sự tái sinh *ex vitro*, hạt với nồng độ alginate là 50 g/l sinh trưởng tốt trong điều kiện *in vitro*.

Ngoài ra, theo nghiên cứu của Nhut và đồng tác giả (2005), hạt nhân tạo của PLB địa lan *Cymbidium* spp. cũng được bọc bằng dung dịch sodium alginate với nhiều nồng độ khác nhau. Tỷ lệ sống sót của các hạt nhân tạo trong điều kiện *in vitro* là 100% và khả năng tái sinh cũng khá cao. Hạt nhân tạo không bị giảm khả năng sống sót sau khi được bảo quản một năm trong môi trường lỏng không chứa đường. Tỷ lệ sống sót của hạt là 35,5% và tỷ lệ tạo chồi là 45,8% khi chuyển hạt trực tiếp sang giá thể dớn không khử trùng sau khi được bọc lớp vỏ chitosan. Cây con tạo

ra từ những hạt nhân tạo này đều sống tốt sau sáu tháng ngoài nhà kính.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát khả năng tái sinh trực tiếp thành cây con *in vitro* của các loại hạt nhân tạo từ nhiều nguồn nguyên liệu được nuôi cấy trong những điều kiện khác nhau, đồng thời thử nghiệm khả năng bảo quản hạt nhân tạo trong điều kiện *in vitro* với số lượng lớn phục vụ công tác giống và làm chậm thời gian tăng trưởng của mầm, phôi nhằm bảo quản nguồn gen thực vật. Phương pháp tạo hạt nhân tạo không những có ý nghĩa khoa học mà còn mang một ý nghĩa kinh tế quan trọng.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

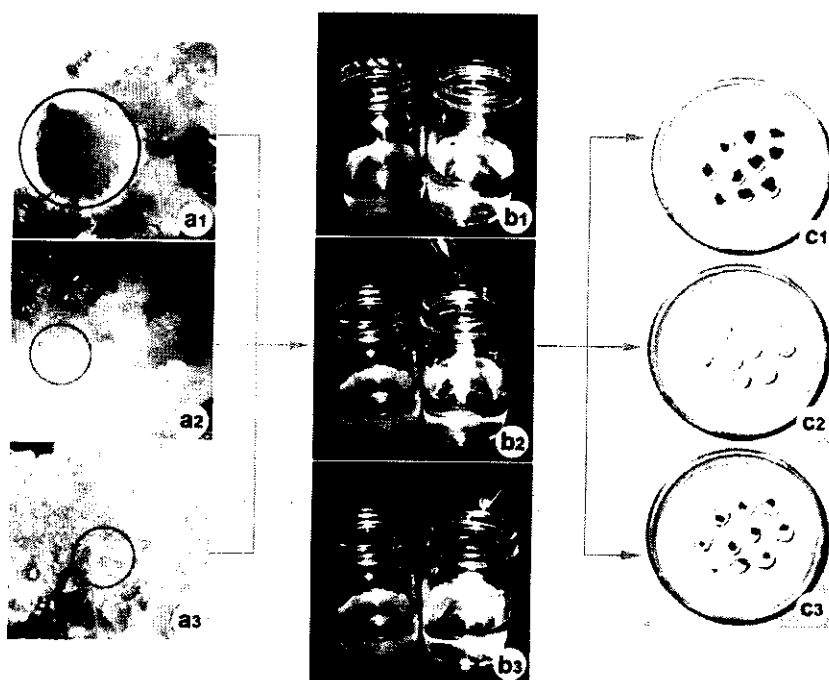
Đối tượng nghiên cứu là giống lan Hồ điệp *Phalaenopsis amabilis* hoa trắng (Hình 1). Nguyên liệu được dùng sản xuất hạt nhân tạo là mô sẹo, phôi, PLB của lan Hồ điệp có nguồn gốc *in vitro*.



Hình 1. *Phalaenopsis amabilis*.

### Phương pháp

Phần nội nhũ nhân tạo được làm giàu bởi 3 g/l Hyponex, 5 ml/l vitamin MS, 30 g/l khoai tây nấu chín (môi trường SA), 30 g/l đường sodium alginate ở các nồng độ khác nhau và điều chỉnh về pH = 5,4, sau đó được hút và nhỏ giọt vào dung dịch  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  100 mM. Quá trình trao đổi ion giữa sodium alginate và  $\text{CaCl}_2$  được giữ trong khoảng 30 phút trước khi hạt được lấy ra và rửa lại bằng nước cất vô trùng. Toàn bộ quy trình tạo hạt nhân tạo được thể hiện trong hình 2.



Hình 2. Quy trình tạo hạt nhân tạo cây hoa lan Hồ điệp *P. amabilis*. PLB (a1), phôi vô tính (a2) và mô sẹo (a3) được tách ra, cho vào dung dịch sodium alginate (b1), hút ra (b2) và nhỏ giọt vào dung dịch  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (b3) và để yên trong 30 phút, sau đó, hạt được gấp ra và rửa lại bằng nước cất vô trùng trong đĩa petri (c1, c2 và c3).

Tùy vào mục đích mà môi trường nuôi cấy được bổ sung các thành phần theo thứ tự như sau: môi trường SA, 30 g/l đường, chỉnh pH về 5,4 - 5,5, 1,0 g/l than hoạt tính và 9 g/l agar.

Nghiên cứu được phân bố thành 4 thí nghiệm chính sau:

**Khảo sát ảnh hưởng của các nồng độ sodium alginate trong vỏ hạt lên khả năng tái sinh in vitro của hạt nhân tạo cây hoa lan Hồ điệp *P. amabilis***

Môi trường tạo vỏ hạt là SA bổ sung sodium alginate ở các nồng độ 30, 40 và 50 g/l. Hạt được nuôi cấy trong các bình thủy tinh chứa môi trường A<sub>3</sub> và A<sub>4</sub>. Riêng đối với hạt nhân tạo từ phôi, hạt còn được khảo sát khả năng tái sinh trên môi trường A<sub>5</sub>, A<sub>6</sub> trong bình tròn thủy tinh và trên môi trường A<sub>7</sub>, A<sub>8</sub> trong bình tam giác. Mỗi bình môi trường được cấy 10 hạt, sử dụng 10 bình cho mỗi công thức. Kết quả thí nghiệm được thu nhận sau 6 tháng đối với hạt nhân tạo từ phôi vô tính và sau 4 tháng đối với hạt nhân tạo từ PLB và mô sẹo.

**Khảo sát ảnh hưởng của các loại môi trường nuôi cấy lên khả năng sống sót của hạt nhân tạo cây hoa lan Hồ điệp *P. amabilis***

Trong thí nghiệm này, chúng tôi chỉ tiến hành khảo sát trên 2 loại hạt là hạt tạo từ PLB và mô sẹo. Hạt nhân tạo có nồng độ sodium alginate trong vỏ hạt là 30 g/l được nuôi cấy trong các môi trường (A<sub>1</sub>), (A<sub>2</sub>), (A<sub>3</sub>), (A<sub>4</sub>). Môi trường (A<sub>1</sub>), (A<sub>2</sub>) với thể tích 10 ml được chứa trong các ống nghiệm có giá thể là cầu giấy lọc (55 × 55 cm) ở mức cao hơn so với mực chất lỏng môi trường nuôi cấy. Mỗi ống nghiệm gồm 1 hạt và sử dụng 50 ống nghiệm cho mỗi công thức. Môi trường (A<sub>3</sub>), (A<sub>4</sub>) được chứa trong các bình thủy tinh. Mỗi bình môi trường có 10 hạt và sử dụng 10 bình cho mỗi công thức. Kết quả thí nghiệm được ghi nhận sau 4 tháng nuôi cấy.

**Khảo sát ảnh hưởng của các loại giá thể lên khả năng sống sót của hạt nhân tạo cây hoa lan Hồ điệp *P. amabilis***

Hạt nhân tạo có nồng độ sodium alginate trong vỏ hạt là 30 g/l được nuôi cấy trong các bình thủy

tinh chứa môi trường ( $A_3$ ) với giá thể là agar. Môi trường ( $A_1$ ), ( $A_2$ ) với giá thể là bông gòn ( $55 \times 55$  cm), cầu giấy lọc ( $55 \times 55$  cm) và môi trường đối chứng là nước cất. Thể tích môi trường lỏng 30 ml vừa đủ ướt hết miếng bông gòn (không ngập bông gòn) và ở giá thể giấy lọc là 15 ml. Mỗi bình môi trường gồm 10 hạt và sử dụng 10 bình cho từng công thức. Sau 4 tháng nuôi cấy, chúng tôi tiến hành ghi nhận các kết quả.

**Khảo sát khả năng sống sót của hạt nhân tạo lan Hồ điệp *P. amabilis* sau một khoảng thời gian bảo quản trong môi trường lỏng không có giá thể**

Hạt nhân tạo từ PLB có nồng độ sodium alginate trong vỏ hạt là 30 g/l và hạt nhân tạo từ mô sẹo có nồng độ sodium alginate trong vỏ hạt là 30, 40 và 50

g/l được bảo quản trong các bình thủy tinh chứa môi trường ( $A_1$ ), ( $A_2$ ) với hàm lượng khoáng đa lượng, vi lượng giảm đi 1/2, 1/5 và 1/10 với mục chất lỏng môi trường ngập hết hạt. Ngoài ra, một mẫu bảo quản hạt bằng nước cất cũng được thực hiện để làm đối chứng. Sau 2 tháng bảo quản, chúng tôi tiến hành thu nhận kết quả.

Thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện chiếu sáng 12 h/ngày, cường độ chiếu sáng là 2500 lux, nhiệt độ phòng sáng là  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  và ẩm độ trung bình từ 75 - 80%.

Trong các thí nghiệm trên, chỉ tiêu theo dõi được ghi nhận gồm tỷ lệ hạt sống sót (%) và tỷ lệ hạt nhiễm nấm (%) trên tổng số hạt khảo sát. Ngoài ra, tỷ lệ hạt nảy chồi (%), tỷ lệ chồi ra lá (%) và tỷ lệ chồi ra rễ trên tổng số hạt sống sót cũng được theo dõi.

**Bảng 1.** Các môi trường được sử dụng trong bảo quản và nuôi cấy hạt nhân tạo lan Hồ điệp *P. amabilis*.

KH	SA	Đường	Than hoạt tính	Agar	Bình chứa
$A_1$	X				Ông nghiệm đặt giá thể cầu giấy lọc, bình thủy tinh tròn 250 ml đặt giá thể cầu giấy lọc hoặc bông gòn
$A_2$	X	X			Ông nghiệm đặt giá thể cầu giấy lọc, bình thủy tinh tròn 250 ml đặt giá thể cầu giấy lọc hoặc bông gòn
$A_3$	X			X	Bình thủy tinh tròn 250 ml
$A_4$	X	X		X	Bình thủy tinh tròn 250 ml
$A_5$	X		X	X	Bình thủy tinh tròn 250 ml
$A_6$	X	X	X	X	Bình thủy tinh tròn 250 ml
$A_7$	X		X		Bình tam giác 250 ml
$A_8$	X	X	X		Bình tam giác 250 ml
$A_1$ 1/2 $A_2$ 1/2	$A_1$ và $A_2$ với hàm lượng khoáng đa lượng, vi lượng giảm đi một nửa				Bình thủy tinh tròn 100 ml
$A_1$ 1/5 $A_2$ 1/5	$A_1$ và $A_2$ với hàm lượng khoáng đa lượng, vi lượng giảm đi 1/5				Bình thủy tinh tròn 100 ml
$A_1$ 1/10 $A_2$ 1/10	$A_1$ và $A_2$ với hàm lượng khoáng đa lượng, vi lượng giảm đi 1/10				Bình thủy tinh tròn 100 ml

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Khảo sát ảnh hưởng của các nồng độ sodium alginate trong vỏ hạt lên khả năng tái sinh *in vitro* của hạt nhân tạo cây hoa lan Hồ điệp *P. amabilis***

Đối với hạt nhân tạo từ phôi có vỏ hạt bổ sung hoặc không bổ sung thêm than hoạt tính, khả năng sống

sót và tái sinh của hạt với các nồng độ sodium alginate khác nhau được thể hiện trên bảng 2.

Kết quả cho thấy, ở môi trường  $A_3$ , tỷ lệ hạt sống sót ở nồng độ 30 g/l alginate là cao nhất (49,3%) so với các công thức còn lại. Hầu hết hạt đều phát sinh đa chồi (4 - 5 chồi). Số lượng lá trên mỗi hạt là 3 - 4 lá. Mỗi hạt trung bình ra một rễ (Hình 3a).

Trong trường hợp vỏ hạt có nồng độ alginate là 40 g/l, tỷ lệ hạt nảy chồi khá cao (65,3%) nhưng tỷ lệ chồi ra lá và rễ thấp, lá nhỏ (0,5 cm) và rễ ngắn (0,3 cm). Trong khi đó với nồng độ alginate là 50 g/l, tỷ lệ nảy chồi đạt 62,1%, phát sinh đa chồi (4 chồi), mỗi chồi có từ 1 - 2 lá.

Ở môi trường có đường (A<sub>4</sub>) tỷ lệ hạt sống sót thấp, tỷ lệ nảy chồi ở nồng độ 30 g/l alginate tương đối cao (40%) so với hai nồng độ còn lại. Tuy nhiên, tỷ lệ ra rễ 33,3% là cao so với các nồng độ alginate ở

môi trường không đường.

Như vậy, từ các số liệu thu được, ta nhận thấy nồng độ alginate trong vỏ hạt có ảnh hưởng đến số lượng chồi và rễ cũng như sức sống của cây được tái sinh trên mỗi hạt. Trong thí nghiệm này, hạt với nồng độ alginate trong vỏ bao là 30 g/l có khả năng tái sinh và phát triển tốt hơn so với hạt có nồng độ alginate trong vỏ bao là 40 và 50 g/l. Điều này mở ra hướng ứng dụng tạo hạt nhân tạo lan Hồ điệp với nồng độ alginate 30 g/l để nhân chồi *in vitro*.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của nồng độ sodium alginate lên khả năng sống sót và tái sinh *in vitro* của hạt nhân tạo từ phôi lan Hồ điệp *P. amabilis* có vỏ hạt có và không bổ sung than hoạt tính.

Môi trường	Nồng độ sodium alginate (g/l)	Tỷ lệ hạt sống sót (%)	Tỷ lệ hạt nảy chồi (%)	Tỷ lệ hạt ra lá (%)	Tỷ lệ hạt ra rễ (%)
Không bổ sung than hoạt tính	30	49,3	62,9	31,4	5,7
	A <sub>3</sub> 40	47,2	65,3	11,8	2,9
	50	44,4	62,1	34,5	3,4
	30	32,6	40,0	26,7	33,3
	A <sub>4</sub> 40	25,0	22,2	11,1	33,3
	50	12,5	-	-	-
Có bổ sung than hoạt tính	30	52,1	68,4	23,7	7,9
	A <sub>5</sub> 40	27,1	23,1	46,2	30,8
	50	25,3	20,7	28,6	5,4
	30	39,6	48,0	40,0	12,2
	A <sub>6</sub> 40	20,8	10,0	55,1	25,3
	50	15,7	25,8	37,0	18,9

Các kết quả trong bảng 2 cho thấy, ở nồng độ alginate 30 g/l trong vỏ hạt trên môi trường không đường, tỷ lệ hạt sống sót đạt 52,1%, tỷ lệ nảy chồi cao (68,4%), tạo cụm PLB. Trong trường hợp vỏ hạt có nồng độ alginate 40 g/l tỷ lệ hạt ra lá và rễ cao (46,2% và 30,8%).

Ngoài ra, ở môi trường có đường, hạt phát sinh mô sẹo. Với nồng độ alginate 30 g/l, đa số hạt phát sinh đa chồi, nhiều rễ. Ở nồng độ alginate là 40 và 50 g/l, hạt phát sinh cụm mô sẹo to có kích thước 1,5 cm (Hình 3b). Trên môi trường lòng không đường hạt nảy chồi và ra rễ rất mạnh (Hình 3c), tuy nhiên cần khảo sát thêm vì đa số hạt đều hoá nâu và chết.

Như vậy, từ các số liệu cho thấy, ở môi trường có đường, hạt có tỷ lệ ra chồi, lá và rễ tương đối đều

nhau. Việc kết hợp than hoạt tính vào vỏ bao alginate làm gia tăng sức sống, sự hô hấp cũng như khả năng biến đổi của phôi vô tính do than hoạt tính có thể bẻ gãy alginate. Mặt khác, than hoạt tính giúp giữ chất dinh dưỡng trong vỏ nên chất dinh dưỡng được cung cấp từ từ cho phôi phát triển (Saiprasad, 2001). Trong trường hợp của thí nghiệm này, than hoạt tính đóng vai trò chất hấp thụ phenol và các sản phẩm thứ cấp của phenol, do vậy, phôi trên môi trường có than hoạt tính tăng trưởng nhanh hơn hẳn so với môi trường không chứa than.

Đối với hạt nhân tạo từ PLB, khả năng sống sót của hạt nhân tạo từ PLB lan Hồ điệp trên môi trường thạch có đường và không đường được thể hiện trong bảng 3.

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của nồng độ sodium alginate lên khả năng sống sót của hạt nhân tạo từ PLB và mô sẹo lan Hồ điệp *P. amabilis*.

	Môi trường	Nồng độ sodium alginate (g/l)	Tỷ lệ hạt sống sót (%)	Tỷ lệ hạt nảy chồi (%)
PLB	A <sub>3</sub>	30	40,5	75,4
		40	10,1	50,5
		50	8,3	60,6
	A <sub>4</sub>	30	30,2	66,7
		40	8,7	50,0
		50	2,9	33,3
Mô sẹo	A <sub>3</sub>	30	7,8	
		40	6,0	
		50	3,4	
	A <sub>4</sub>	30	12,7	
		40	8,5	
		50	6,4	

So sánh ở hai môi trường có đường và không đường với các nồng độ alginate 30, 40 và 50 g/l ta thấy tỷ lệ hạt sống sót trên môi trường không đường ở nồng độ 30 g/l là tốt nhất. Điều này đúng với thí nghiệm của Hahn và Paek (2001): PLB nảy mầm tốt trong điều kiện đậm đặc, khoáng thấp (Park *et al.*, 2000) và hàm lượng thấp cacbohydrate để nảy mầm (Hình 4b).

Vấn đề thường gặp trong nuôi cấy mô lan Hồ điệp là hàm lượng phenol tiết ra từ mô nuôi cấy quá cao, phenol sẽ khuếch tán vào môi trường làm oxy hóa các chất trong môi trường, gây độc cho mô nuôi cấy, kết quả là mẫu cấy sẽ bị hóa nâu hoặc đen và chết (Morel, 1974; Flamee và Boesman, 1977; Fast, 1979). Hiện tượng thâm đen của PLB trên môi trường không chứa than hoạt tính cho thấy PLB đang bị nhiễm độc bởi các hợp chất phenol do chính chúng tiết ra, sự tăng trưởng của chúng bị ức chế. Như vậy, để sự tăng sinh của PLB xảy ra thuận lợi thì nên bổ sung than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy.

Hạt nhân tạo từ mô sẹo lan Hồ điệp cũng được nuôi cấy trên môi trường có đường và không đường nhưng tỷ lệ sống sót của hạt không cao (Bảng 3). Mô sẹo của lan được thu nhận đầu tiên nhờ gieo hạt trong điều kiện *in vitro* (Curtis, 1947; Rao, 1963), sau đó, các mô sẹo này được sử dụng để nhân giống vô tính thông qua con đường sinh tạo cơ quan. Kim (1994) tạo mô sẹo từ lát cắt phát hoa còn Ishii (1997) tạo được mô sẹo từ PLB và lá *in vitro*, các mô sẹo

trong trường hợp này có dạng hình hạt, hơi xốp, màu vàng làm nguyên liệu tạo hạt nhân tạo. Mô sẹo này được cấu thành bởi những tế bào vô tổ chức chưa biệt hóa (Rao, 1963). Ở *Phalaenopsis*, các mô sẹo này có mang tế bào sinh tạo phôi, chúng có khả năng sinh tạo phôi và không sinh tạo cơ quan.

Tất cả các môi trường tạo mô sẹo đều cần bổ sung đường, chẳng hạn Lin (1986) sử dụng môi trường bổ sung 20 g/l đường, Tanaka và Sakanishi (1977) sử dụng môi trường bổ sung 40 g/l đường. Trong thí nghiệm này, mô sẹo được bao bọc trong môi trường có đường và trên môi trường thạch có đường thì tốt hơn trên môi trường không đường. Tuy nhiên, tỷ lệ sống sót của hạt nhân tạo từ mô sẹo lại thấp vì vật liệu tạo mô sẹo trong thí nghiệm này là PLB phát sinh từ lá *in vitro*.

Trong thí nghiệm này, với các nguồn mẫu khác nhau được sử dụng để tạo hạt nhân tạo (mô sẹo, phôi, PLB lan Hồ điệp), các nồng độ sodium alginate khác nhau trong vỏ hạt (30 - 50 g/l) đều đưa ra kết quả tương tự nhau về tỷ lệ sống sót và tỷ lệ nảy chồi của hạt. Tuy nhiên, phôi vô tính là một nguồn nguyên liệu lý tưởng nhất để tạo hạt, hạt nhân tạo từ phôi vô tính giống với hạt ngoài tự nhiên vì nó cung cấp cho phôi vô tính một lớp vỏ bao dinh dưỡng bên ngoài. Tỷ lệ hạt nhân tạo này mầm khá cao là do chất lượng phôi tốt và do môi trường tạo vỏ bao cũng như sử dụng alginate với nồng độ thích hợp (30 g/l). Hạt nhân tạo được nuôi cấy trên môi trường thạch không

đường có bổ sung than hoạt tính có tỷ lệ sống sót và nảy mầm cao hơn so với môi trường không bổ sung than hoạt tính.

#### Khảo sát ảnh hưởng của các loại môi trường nuôi cấy lên khả năng sống sót của hạt nhân tạo cây hoa lan Hồ điệp *P. amabilis*

Đối với hạt nhân tạo từ PLB lan Hồ điệp, khả năng sống sót của hạt nhân tạo lan Hồ điệp trên các môi trường nuôi cấy khác nhau được thể hiện trên bảng 4. Trong thí nghiệm này, hạt có nồng độ alginate trong vỏ hạt là 30 g/l. Môi trường lỏng A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> (không đường và có đường) được chứa trong ống nghiệm với giá thể là giấy lọc.

Các kết quả cho thấy, sau 2 tháng nuôi cấy trên các loại môi trường khác nhau, hạt nhân tạo lan Hồ điệp có tỷ lệ sống sót là 40,2% trên môi trường agar không đường và trên môi trường lỏng với giá thể cầu giấy lọc thì hạt hầu như không có khả năng sống sót. Như vậy, từ sự phát triển của hạt trên hai loại giá thể agar và giấy lọc, ta có thể rút ra kết luận giá thể agar là thích hợp hơn để hạt nhân tạo lan Hồ điệp tái sinh chồi và rễ. Ngoài ra, agar giúp cho chồi đứng vững và bộ rễ phát triển ổn định, trong khi giá thể giấy chỉ có tác dụng giúp chồi không bị ngập trong môi trường lỏng.

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của các loại môi trường nuôi cấy lên khả năng sống sót của hạt nhân tạo từ PLB và mô sẹo của cây hoa lan Hồ điệp *P. amabilis*.

	Môi trường	Tỷ lệ hạt sống sót (%)
PLB	A <sub>1</sub>	5,3
	A <sub>2</sub>	3,4
	A <sub>3</sub>	40,2
	A <sub>4</sub>	30,0
Mô sẹo	A <sub>1</sub>	1,4
	A <sub>2</sub>	3,5
	A <sub>3</sub>	7,8
	A <sub>4</sub>	12,7

Đối với hạt nhân tạo từ mô sẹo lan Hồ điệp, hạt nhân tạo được nuôi cấy trên các môi trường khác nhau sau 2 tháng thể hiện trong bảng 4.

Trên môi trường lỏng không bổ sung đường (A<sub>1</sub>), hạt có tỷ lệ sống sót thấp hơn trên môi trường

có bổ sung đường (A<sub>2</sub>). Trên môi trường đặc thì tỷ lệ sống sót của hạt cao hơn môi trường lỏng. Hạt nhân tạo trước và một thời gian sau khi nảy mầm chưa thể tự dưỡng được, do đó, môi trường gieo hạt vẫn phải có đường để cung cấp cho nó nguồn carbon cần thiết trong giai đoạn đầu hạt nảy mầm. Vì vậy, hạt có tỷ lệ sống sót thấp trên môi trường không đường là do mô sẹo cần đường để tăng sinh (Kim, 1994).

Đối với lan Hồ điệp, hạt nhân tạo sau quá trình nuôi cấy trên các loại môi trường cho kết quả: hạt nhân tạo từ PLB sống sót và tái sinh tốt trên môi trường thạch không đường. Điều này phù hợp với những nghiên cứu trước đây của Kim (1994) vì PLB của cây hoa lan Hồ điệp cần môi trường có hàm lượng đạm cao và lượng đường (carbohydrate) thấp để phát sinh cây. Hạt nhân tạo từ mô sẹo thì ngược lại, chúng tái sinh tốt trên môi trường có đường, tuy nhiên, hạt nhân tạo từ mô sẹo không có khả năng sống sót cao như hạt nhân tạo từ PLB. Kết quả cho thấy giá thể thích hợp cho hạt phát triển là agar.

#### Khảo sát ảnh hưởng của các loại giá thể lên khả năng sống sót của hạt nhân tạo cây hoa lan Hồ điệp *P. amabilis*

Đối với hạt nhân tạo từ PLB lan Hồ điệp, khả năng sống sót của hạt nhân tạo lan Hồ điệp trên các giá thể khác nhau được thể hiện trên bảng 5. Trong thí nghiệm này, vỏ hạt có nồng độ alginate 30 g/l, hạt được nuôi cấy trên môi trường A<sub>3</sub> (giá thể agar) và các giá thể còn lại được bổ sung môi trường A<sub>1</sub> và A<sub>2</sub>.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, hạt nhân tạo lan Hồ điệp có khả năng sống sót cao (87%) trên giá thể bông gòn có 30 ml môi trường A<sub>1</sub> (Hình 4a).

Đối với hạt nhân tạo từ mô sẹo với nồng độ sodium alginate là 30, 40 và 50 g/l, hạt được nuôi cấy trên các giá thể khác nhau thể hiện ở bảng 5. Hạt nhân tạo có nồng độ Sodium alginate là 40 và 50 g/l thì hầu như không có khả năng sống sót. Dựa vào bảng 5, ta thấy tỷ lệ hạt có khả năng sống sót khá cao (37,5%) trên giá thể bông gòn với môi trường lỏng không đường. Tuy nhiên, hạt lại có khả năng sống sót là 100% trên giá thể bông gòn với môi trường chỉ là nước cất (thực nghiệm cũng cho thấy môi trường có hàm lượng dinh dưỡng thấp phù hợp hơn cho việc nuôi cấy mô cây hoa lan), vì vỏ hạt đã có đủ dinh dưỡng N - P - K cũng như đường và vitamin giúp mô sẹo bên trong duy trì sự sống của nó nhưng không phát triển nhiều (Hình 5a, 5b).

Thử nghiệm các giá thể khác nhau để nuôi cấy hạt nhân tạo lan Hồ điệp từ PLB và mô sẹo ta đều ghi

nhận được kết quả tương tự là hạt có khả năng tái sinh cao khi được nuôi cấy trên giá thể bông gòn vì bông

gòn nâng đỡ và giúp các chất dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy khuếch tán đến vị trí của hạt tốt nhất.

**Bảng 5.** Ảnh hưởng của các loại giá thể lên khả năng sống sót của hạt nhân tạo từ PLB và mô sẹo lan Hồ điệp *Phalaenopsis amabilis*.

	Giá thể	Môi trường	Tỷ lệ hạt sống sót (%)
PLB	Agar	A <sub>3</sub>	40,5
		A <sub>4</sub>	30,2
	Cầu giấy lọc	A <sub>1</sub>	4,7
		A <sub>2</sub>	3,2
	Bông gòn	A <sub>1</sub>	87,1
		A <sub>2</sub>	40,2
Mô sẹo	Agar	A <sub>3</sub>	7,8
		A <sub>4</sub>	12,7
	Cầu giấy lọc	A <sub>1</sub>	2,5
		A <sub>2</sub>	0,8
	Bông gòn	A <sub>1</sub>	37,5
		A <sub>2</sub>	25,0
		Nước cất	100,0

**Khảo sát khả năng sống sót của hạt nhân tạo lan Hồ điệp *P. amabilis* sau một khoảng thời gian bảo quản trong môi trường lỏng không có giá thể**

Trong thí nghiệm này, hạt nhân tạo từ PLB chứa 30 g/l alginate trong vỏ hạt được bảo quản trong môi trường A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> với hàm lượng giảm khoáng đa lượng, vi lượng giảm còn 1/2, 1/5 và 1/10 ở nhiệt độ phòng. Trong khoảng thời gian 1,5 tháng, môi trường bảo quản trong, đồng thời tất cả các hạt vẫn sống và không biểu hiện sự tái sinh (không nảy chồi và không ra lá, rễ). Kể từ tháng thứ 2 trở đi một số ít PLB dần hóa vàng và ta nhận thấy ở môi trường có đường với hàm lượng khoáng đa lượng, vi lượng giảm đi một nửa thì hạt có khả năng sống sót là 100% và hạt vẫn chưa có biểu hiện nảy mầm (Hình 4c). Khi ta thử nghiệm hạt nhân tạo bảo quản khô và trên nước cất thì chỉ trong bốn tuần hạt ở bình khô đã nảy mầm và sau 5 tuần hạt bắt đầu hoá đen, còn bảo quản trong nước cất thì sau 6 tuần hạt dần hóa nâu.

Ta nên lưu ý lượng dung dịch cho vào hạt và số lượng hạt vì nếu như để hạt ngập sâu trong dung dịch, hạt sẽ không thể hô hấp và dẫn đến hiện tượng hạt bị ngập úng cũng như dần mất khả năng tái lập sự sống sau khi chuyển sang môi trường thích hợp cho sự nảy chồi. Để có thể kéo dài thời gian bảo quản hạt trong môi trường cần chú ý tạo điều kiện

thông thoáng cho hạt hô hấp, hay nói cách khác là ta cần thiết lập được một thể tích môi trường bảo quản phù hợp. Vì vậy, thời gian bảo quản và thể tích dịch lỏng bảo quản có ý nghĩa quan trọng trong công tác nhân giống.

Đối với hạt nhân tạo từ mô sẹo, nồng độ alginate trong vỏ hạt là 30, 40 và 50 g/l được bảo quản trong các môi trường A<sub>1</sub> và A<sub>2</sub> với hàm lượng dinh dưỡng giảm đi 1/2, 1/5 và 1/10. Ta nhận thấy: hầu hết trong các môi trường bảo quản hạt đều có khả năng sống trên 70%. Tuy nhiên, hạt được bảo quản trong môi trường không đường với hàm lượng dinh dưỡng giảm đi một nửa sau 2 tháng tỷ lệ sống sót là 100% và so với các bình còn lại thì vẫn chưa có hiện tượng nảy mầm (Hình 5c).

Theo Ipekci và Gozukirmizi (2003), việc bảo quản hạt nhân tạo *Paulownia elongata* ở 4°C cho kết quả phôi sống sót và nảy mầm tốt. Thời gian bảo quản hạt nhân tạo cỏ linh lăng cũng rất ngắn (Redenbaugh *et al.*, 1987), tỷ lệ nảy mầm của hạt nhân tạo *Asparagus cooperi* (Ghosh, Sen, 1994) bị giảm ở 4°C. Tuy nhiên, ở đối tượng lan Hồ điệp, PLB được bảo quản trong môi trường A<sub>2</sub> 1/2 (có đường) ở điều kiện phòng trong thời gian 2 tháng, hạt vẫn có tỷ lệ sống sót 100% và hạt nhân tạo từ mô sẹo trên môi trường A<sub>1</sub> 1/2 (không đường) bảo quản

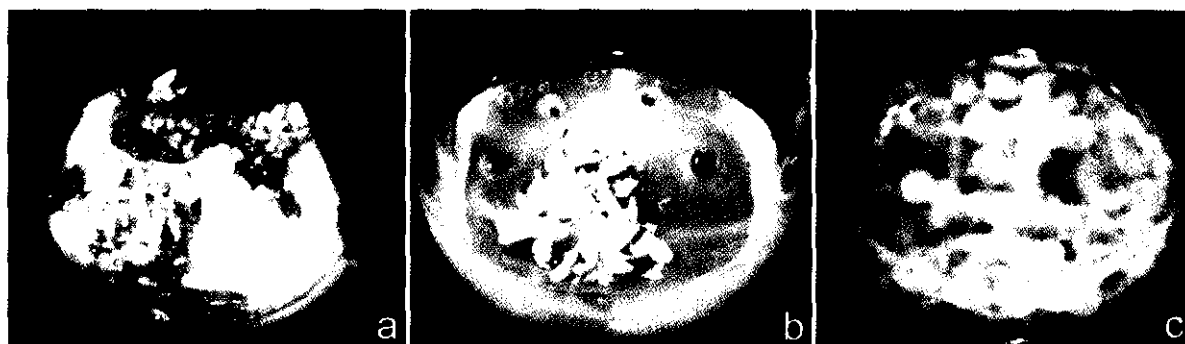


trong 2 tháng thì tỷ lệ sống là 100%. Điều này có ý nghĩa quan trọng trong công tác nhân giống và bảo

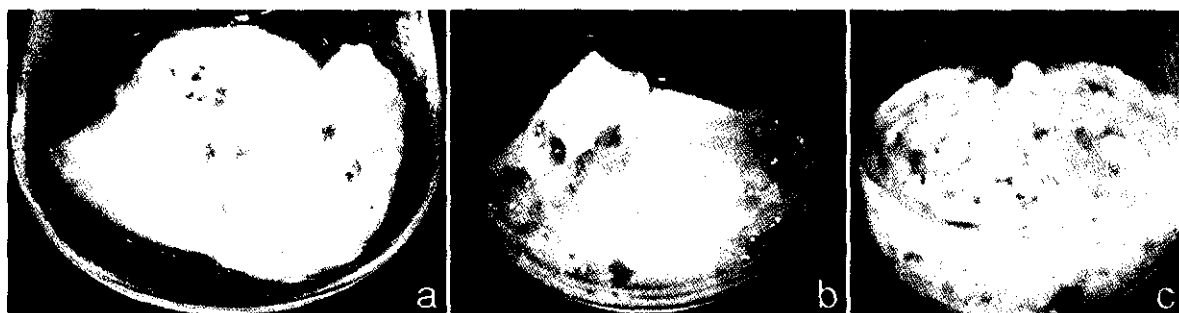
quản vì thời gian bảo quản lâu dài giúp làm giảm chi phí nhân công.



**Hình 3.** Sự nảy mầm của hạt nhân tạo có nguồn gốc từ phôi cây hoa lan Hồ điệp *Phalaenopsis amabilis*. Sự nảy mầm của hạt ở nồng độ sodium alginate 30 g/l trên môi trường thạch không đường (a); sự nảy mầm của hạt ở nồng độ sodium alginate 30 g/l trên môi trường thạch có đường và bổ sung than hoạt tính (b); sự nảy mầm của hạt ở nồng độ sodium alginate 30 g/l trên môi trường lỏng không đường có bổ sung than hoạt tính (c).



**Hình 4.** Sự nảy mầm của hạt nhân tạo có nguồn gốc từ PLB của cây hoa lan Hồ điệp *Phalaenopsis amabilis*. Sự nảy mầm của hạt ở nồng độ sodium alginate 30 g/l trên môi trường thạch không đường (a); sự nảy mầm của hạt trên giá thể bông gòn trong môi trường lỏng không đường (b); hạt sau 2 tháng bảo quản trên môi trường có đường với hàm lượng dinh dưỡng giảm một nửa (c).



**Hình 5.** Sự nảy mầm của hạt nhân tạo có nguồn gốc từ mô sẹo của cây hoa lan Hồ điệp *Phalaenopsis amabilis*. Sự nảy mầm của hạt trên giá thể bông gòn với môi trường nước cất (a); sự nảy mầm của hạt trên giá thể bông gòn với môi trường lỏng không đường (b); hạt sau 2 tháng bảo quản trên môi trường không đường với hàm lượng dinh dưỡng giảm một nửa (c).

## KẾT LUẬN

Việc khảo sát ảnh hưởng của các nồng độ alginate trong vỏ hạt, môi trường nuôi cấy và giá thể khác nhau lên sự tái sinh cây *in vitro* của hạt nhân tạo từ nhiều nguồn nguyên liệu của cây hoa lan Hồ điệp cho thấy rằng phôi là nguồn nguyên liệu tốt nhất để tạo hạt nhân tạo, nồng độ alginate 30 g/l trong dung dịch tạo vỏ hạt là nồng độ tối ưu giúp hạt có tỷ lệ nảy mầm cao. Đồng thời, việc nuôi cấy hạt trên giá thể giúp môi trường lỏng khuếch tán dinh dưỡng tốt (bông gòn) tạo điều kiện thuận lợi cho sự tái sinh cây *in vitro* của hạt hơn là các giá thể rắn khác và môi trường nuôi cấy có nồng độ carbohydrate thấp phù hợp hơn cho sự tái sinh này. Ngoài ra, môi trường lỏng bảo quản hạt cũng không cần lượng carbohydrate cao và nồng độ dinh dưỡng cũng có thể được giảm còn khoảng 1/2 - 1/5 so với môi trường nuôi cấy.

**Lời cảm ơn:** Các tác giả xin chân thành cảm ơn Phòng Công nghệ Thực vật (Phân Viện Sinh học tại Đà Lạt) đã hỗ trợ kinh phí cho chúng tôi hoàn thành đề tài nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Curtis JT (1947) Studies on the nitrogen nutrition of orchid embryos. In Complex nitrogen sources. *Am Orchid Soc Bull* 16: 654-660.
- Drew R (1979) The development of carrot (*Daucus carota* L.) embryoids (derived from cell suspension culture) into plantlets on a sugar-free basal medium. *Hort Res* 19: 79-84.
- Dương Tấn Nhựt, Trần Ngọc Thủy Tiên, Mai Thị Ngọc Hương, Nguyễn Thị Thanh Hiền, Phan Xuân Huyền, Bùi Văn Lê, Đỗ Năng Vịnh (2004) Một số nghiên cứu về hạt nhân tạo của hoa Lily (*Lilium* spp.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 2(3): 359-370.
- Fast G (1979) Klonvermehrung von *Phragmipedium sedenii* and *Phalaenopsis bybr.* aus Blütenknospen. *Die Orchidee* 30: 241-244.
- Flamee M, Boesman G (1977) Clonal multiplication of *Phalaenopsis* hybrids by means of sections of flower stalks. *Med Fac Landbouw Rijksuniv Ghent* 42: 1865-1868.
- Fukai S, Togashi M, Goi M (1994) Cryopreservation of *in vitro*-grown *Dianthus* by encapsulation-dehydration. *Technical Bulletin of Faculty of Agriculture, Kagawa University* 46(2): 101-107.
- Ghosh B, Sen S (1994) Plant regeneration from alginate encapsulated somatic embryos of *Asparagus cooperi* baker. *Plant Cell Rep* 9: 189-194.
- Hahn EJ, Paek KY (2001) High photosynthetic photon flux and high CO<sub>2</sub> concentration under increased number of air exchanges promote growth and photosynthesis of four kinds of orchid plantlets *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37: 678-682.
- Ipekci Z, Gozukirmizi N (2003) Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*. *Plant Cell Rep* 22: 16-24.
- Ishii Y (1997) Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Rep* 17: 446-450.
- Jung SJ, Yoon ES, Jeong JH, Choi YE (2004) Enhanced post-germinative growth of encapsulated somatic embryos of *Siberian ginseng* by carbohydrate addition to the encapsulation matrix. *Plant Cell Rep* 23: 365-370.
- Kersulec A, Bazinet C, Corbinau F, Come D, Barbotin JN, Hervagault JF, Thomas D (1993) Physiological behaviours of encapsulated somatic embryos. *Biom Art Cells Immo Biotech* 21: 275-281.
- Kim SY (1994) Somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *PhD dissertation*. University of Hawaii.
- Kitto S, Janick J (1982) Polyox as an artificial seed coat for asexual embryo. *Hort Sci* 17: 448.
- Kitto S, Janick J (1985) Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot. *J Am Soc Hort Sci* 110: 277-282.
- Lin CC (1986) *In vitro* culture of flower internodes of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*. *Lind* 1: 158-163.
- Malemngaba H, Roy BK, Bhattacharya S, Deka PC (1996) *Indian J Exp Biol* 34: 801-805.
- Morel G (1974) *Clonal multiplication of orchids*. In Withner CL ed. *The orchids: Scientific studies*. Wiley-Interscience, New York, 169-222.
- Nguyễn Văn Uyển (1992) *Những phương pháp Công nghệ sinh học Thực vật*, tập 2, Nhà Xuất Bản Nông Nghiệp.
- Nhut DT, Tien TNT, Huong MTN, Hien NTT, Huyen PX, Luan VQ, Teixeira DA, Silva JA (2005) Artificial seeds for propagation and preservation of *Cymbidium* spp. *Prop Orn Plants* 5(2): 3-9.
- Park SY, Murthy HN, Paek KY (2000) Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 63: 67-72.

- Patel AV, Pusch I, Mix-Wagner G, Vorlop KD (2000) A novel encapsulation technique for the production of artificial seeds. *Plant Cell Rep* 19: 868-874.
- Rao AN (1963) *Organogenesis in Callus Culture of Orchid Seeds*. In Maheshwari P, Ranga swami NS eds. *Plant tissue and Organ Culture N.A Symposium*. Intern. Soc. Plant Morphologist, Delhi, India: 332-344.
- Redenbaugh K, Fujii J, Slade D, Viss P, Kossler M (1991) *Artificial seeds encapsulated somatic embryos*. In Bajaj YPS ed. *High technology and micropropagation. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer, Heidelberg Berlin, New York 17: 395-416.
- Redenbaugh K, Slade D, Viss P, Fujii J (1987) Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. *Hort Sci* 22(5): 803-809.
- Saiprasad GVS (2001) Artificial seeds and their applications. *Resonance*: 39-47.
- Sharma A, Tadon P, Kumar A (1992) Regeneration of plantlets from encapsulated *Dendrobium* protocorms. *Ind Exp Bio* 30: 744-748.
- Singh F (1991) Encapsulation of *Spathoglottis plicata* protocorms. *Lind* 6: 61-64.
- Stephen R, Jayabalan N (2000) Artificial seed production in Coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Plant Tiss Cult* 10(1): 45-49.
- Tanaka M, Sakanishi Y (1977) Clonal propagation of *Phalaenopsis* tissue culture. *Am Orchid Soc Bull* 46: 733-737.
- Tay LF, Khoh LK, Loh CS & Khor E (1993) Alginate-chitosan coacervation in production of artificial seeds. *Biotech Bioengineer* 42: 449-454.
- Walker K, Sato S (1981) Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*: the role of ammonium ion in somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 1: 109-121.

## REGENERATION AND STORAGE OF *PHALAENOPSIS* ARTIFICIAL SEEDS

Duong Tan Nhut<sup>1,\*</sup>, Nguyen Thi Kim Tuyen<sup>1</sup>, Nguyen Duy<sup>2</sup>, Mai Xuan Phan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dalat Affiliate Institute of Biology

<sup>2</sup>Institute of Agricultural Sciences of Southern Vietnam

### SUMMARY

*Phalaenopsis* spp. is one of the most beautiful and favourite orchids all over the world. Micropropagation methods of this orchid have encountered many difficulties such as short time of plantlet preservation, high production cost and great requirement of preservation space. Artificial seed production of *Phalaenopsis* spp. is considered as an innovative and effective solution for micropropagation and storage of this valuable species. In this study, *Phalaenopsis* artificial seed production procedure was presented. Sodium alginate concentration of 30 g l<sup>-1</sup> was optimal for artificial seed germination. Highest survival rate (87%) of PLB-derived artificial seeds was recorded in liquid medium containing 3 g l<sup>-1</sup> Hyponex, MS vitamins, 30 g l<sup>-1</sup> potato extract with cotton as substrate. Highest survival rate (100%) of callus-derived artificial seeds was recorded in sterilized distilled water. *Phalaenopsis* artificial seeds did not show survival ability at room temperature. However, optimal artificial seed maintenance was observed in 1.5 g l<sup>-1</sup> Hyponex, 1/2 MS vitamins, and 15 g l<sup>-1</sup> potato extract. Among calli, embryos and protocorm-like bodies (PLBs) derived from *in vitro* *Phalaenopsis* embryos were approved to be the most appropriate initial materials for artificial seed production; hence, further studies on *Phalaenopsis* artificial seed production using embryos is recommended. This study is a basis for further investigation on artificial seed production of *Phalaenopsis*, promising large-scale application in micropropagation, storage, transportation.

**Keywords:** Artificial seed, Hyponex, *Phalaenopsis amabilis*, sodium alginate, survival rate

\* Author for correspondence: Tel: 84-63-831056; Fax: 84-63-831028, E-mail: [duongtannhut@yahoo.com](mailto:duongtannhut@yahoo.com)