

CẢM ỨNG TẠO MÔ SẸO CÓ KHẢ NĂNG SINH PHÔI LÀM NGUỒN MẪU CHO PHÁT SINH PHÔI VÔ TÍNH VÀ NUÔI CÂY HUỖN PHỤ TẾ BÀO LAN HỒ ĐIỆP (*PHALAENOPSIS AMABILIS*)

Trịnh Thị Lan Anh¹, Nguyễn Quốc Hiệu², Nguyễn Thị Kim Loan³, Nguyễn Thanh Sang³, Hoàng Thanh Tùng³, Võ Thị Bạch Mai¹, Dương Tấn Nhựt³

¹Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh

²Đại học Công nghệ TP. Hồ Chí Minh

³Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài: 08.5.2014

Ngày nhận đăng: 01.8.2014

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, các yếu tố ảnh hưởng lên sự cảm ứng hình thành mô sẹo có khả năng sinh phôi, sự hình thành phôi vô tính và nuôi cấy huyền phụ tế bào lan Hồ điệp đã được khảo sát. PLB (protocorm-like body) thu được từ lá của chồi lan Hồ điệp có nguồn gốc từ nuôi cấy phát hoa được sử dụng để cảm ứng hình thành mô sẹo có khả năng sinh phôi. Kết quả cho thấy, mô sẹo được tạo ra tốt nhất từ lớp mỏng cắt dọc PLB trong môi trường có bổ sung 10 g/l mannitol. Ngoài ra, các lớp mỏng cắt dọc của PLB được cấy vào môi trường có bổ sung 3 mg/l adenine cho tỷ lệ tạo mô sẹo cao nhất. Nguồn mô sẹo này được sử dụng để khảo sát khả năng phát sinh phôi vô tính và nuôi cấy huyền phụ tế bào. Môi trường khoáng và nồng độ sucrose có ảnh hưởng đến khả năng phát sinh phôi; môi trường thích hợp nhất cho tạo phôi là môi trường MS bổ sung 40 g/l sucrose. Trong các nguồn carbohydrate (sucrose, glucose, lactose, maltose, manitol và tinh bột) được bổ sung vào môi trường MS với nồng độ 40 g/l thì glucose thích hợp cho tạo phôi. Thêm vào đó, điều kiện nuôi cấy lỏng lẻo cũng thích hợp cho nuôi cấy huyền phụ tế bào lan Hồ điệp. Kết quả của nghiên cứu này có thể được ứng dụng để hoàn thiện quy trình vi nhân giống lan Hồ điệp thông qua phương pháp phát sinh phôi và nuôi cấy huyền phụ tế bào.

Từ khóa: Huyền phụ tế bào, lan Hồ điệp, mô sẹo có khả năng sinh phôi, phát sinh phôi vô tính, PLB

MỞ ĐẦU

Hiện nay, việc nhân giống lan Hồ điệp bằng hạt được sử dụng rộng rãi; tuy nhiên, việc nuôi cấy bằng hạt thường tạo ra biến dị, vì vậy, việc nuôi cấy hạt không thể tạo được cây con đồng nhất (Arditti, 1992). Do đó, để tạo cây con đồng loạt cần phải áp dụng phương pháp nhân giống vô tính. Khó khăn lớn nhất trong nhân giống vô tính lan Hồ điệp là nguồn mẫu rất hạn chế do chúng là lan đơn thân, sử dụng chồi đỉnh để nuôi cấy như nhiều loài lan khác sẽ làm tổn thương cây mẹ (Intuwong, Sagawa, 1974). Hơn nữa, lan Hồ điệp thường tiết nhiều hợp chất phenol từ bề mặt vết cắt ra môi trường nuôi cấy, gây độc cho mẫu. Có rất nhiều báo cáo về quy trình tái sinh *in vitro* của loài lan Hồ điệp (Reuter, 1983; Tanaka, 1987; Tokuhara, Mii, 1993). Tuy nhiên, không phải tất cả các phương pháp này có thể sử dụng được cho vi nhân giống thương mại vì có sự khác nhau về tỷ lệ sống sót của chồi, sự tạo thành PLB và tái sinh cây con. Đối với lan Hồ điệp các quá trình tái sinh của

các loại nguồn mẫu thường rất thấp (Tokuhara, Mii, 2001). Những đoạn cắt theo chiều ngang có nguồn gốc từ cả thân, lá, rễ hoặc trực phát hoa cũng đã được sử dụng cho tái sinh cây cảnh và cũng được sử dụng cho nghiên cứu tái sinh trên cây lan Hồ điệp (Le *et al.*, 1999; Nhut *et al.*, 2001; Da Silva, 2003).

Trong nhiều loài thực vật, sự tái sinh cây từ mô sẹo, đặc biệt là các mô sẹo có khả năng phát sinh phôi đã được ghi nhận là một trong những kỹ thuật thiết yếu cho vi nhân giống và các ứng dụng công nghệ sinh học. Các báo cáo về sự tái sinh cây từ mô sẹo có khả năng phát sinh phôi ở các loài lan còn rất hạn chế. Sự hình thành mô sẹo ở lan Hồ điệp đã được báo cáo lần đầu tiên bởi Sajise và Sagawa (1991), tuy nhiên họ không miêu tả rõ phương pháp cảm ứng tạo mô sẹo. Ở lan Hồ điệp, sự cảm ứng tạo mô sẹo thu được từ PLB được cảm ứng từ nuôi cấy các đỉnh chồi của các nụ bên trên các phát hoa (Ichihashi, 1992) và các mảnh lá (Ishii *et al.*, 1998). Nuôi cấy mô sẹo có khả năng phát sinh phôi hoặc

nuôi cấy huyền phù tế bào sẽ mang lại những ứng dụng hiệu quả trong các nghiên cứu về sự lai tạo phối soma và sự biến đổi di truyền (Belarmino, Mii, 2000). Phương pháp này được mong đợi mang lại ứng dụng hiệu quả cho vi nhân giống lan Hồ điệp bởi vì nuôi cấy mô sẹo và huyền phù tế bào đều cho tỷ lệ tái sinh cao mà không đánh mất tiềm năng phát sinh phối vô tính.

Vì vậy, việc cải tiến quy trình nhân giống, nghiên cứu tạo mô sẹo làm nguồn nguyên liệu cho ứng dụng công nghệ phát sinh phối vô tính và nuôi cấy huyền phù tế bào trong nhân giống lan Hồ điệp là một bước tiến lớn nó góp phần nhân nhanh loài lan quý này, cho cây con đồng nhất về hình thái và về mặt di truyền, có thể tạo giống hàng loạt, phục vụ công tác trồng trọt trên diện rộng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguồn mẫu

Nguồn mẫu sử dụng trong các thí nghiệm tạo mô sẹo có khả năng sinh phối là PLB (được tạo thành từ các mẫu cây lá của chồi được hình thành từ nuôi cấy phát hoa) có tại phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng (Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên). Sau đó các mô sẹo có khả năng sinh phối này được dùng làm nguồn mẫu cho nghiên cứu phát sinh phối vô tính và nuôi cấy huyền phù tế bào.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường chứa trong các bình thủy tinh loại 100 ml (chứa 30 ml/bình) và bình thủy tinh 250 ml (chứa 40 ml/bình). Môi trường sử dụng là môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) bổ sung các thành phần khác nhau tùy thuộc vào mục đích thí nghiệm và pH 5,8; sau đó khử trùng trong autoclave ở nhiệt độ 121°C (1 atm) trong thời gian 20 phút.

Đối với thí nghiệm tạo mô sẹo có khả năng sinh phối từ PLB và nuôi cấy phát sinh phối từ mô sẹo được thực hiện trong điều kiện tối. Đối với nuôi cấy huyền phù tế bào, các mẫu mô sẹo có khả năng phát sinh phối được nuôi cấy trên máy lắc (Orbital Shaker S01) với tốc độ lắc 100 vòng/phút. Tất cả các thí nghiệm (ngoại trừ trong điều kiện tối) được nuôi ở 25 ± 2°C với thời gian chiếu sáng là 16 giờ/ngày (cường độ ánh sáng: 2.500 – 3.000 lux).

Bố trí thí nghiệm

Khảo sát ảnh hưởng của mannitol đến sự tạo mô sẹo có khả năng sinh phối từ lớp mỏng tế bào cắt dọc PLB lan Hồ điệp

Các lớp mỏng tế bào cắt dọc (ITCL) PLB được cấy vào môi trường MS có bổ sung 0,1 mg/l BA, 0,01 mg/l 2,4-D, 1 g/l cao nấm men, 20% nước dừa, 9 g/l agar, 1 g/l than hoạt tính kết hợp với mannitol ở nồng độ khác nhau (0; 10; 20; 30; 40 mg/l).

Khảo sát ảnh hưởng của adenine đến sự tạo mô sẹo có khả năng sinh phối từ PLB lan Hồ điệp

Các ITCL-PLB được cấy vào môi trường MS có bổ sung 0,1 mg/l BA, 0,01 mg/l 2,4-D, 1 g/l cao nấm men, 20% nước dừa, 9 g/l agar, 1 g/l than hoạt tính kết hợp với adenine ở nồng độ khác nhau (0; 1; 2; 3; 4 mg/l).

Khảo sát ảnh hưởng của môi trường khoáng và sucrose lên quá trình phát sinh phối vô tính lan Hồ điệp từ mô sẹo có khả năng sinh phối

Các cụm mô sẹo có khả năng sinh phối (thu được từ các thí nghiệm tạo mô sẹo) được cấy vào môi trường có thành phần khoáng thay đổi [MS0 (không sử dụng khoáng đa lượng), ½MS (có hàm lượng khoáng đa lượng MS giảm đi một nửa), MS] có bổ sung 2,0 mg/l BA; 0,5 mg/l NAA; 1 g/l cao nấm men; 20% nước dừa; 9 g/l agar; 1 g/l than hoạt tính và sucrose ở nồng độ khác nhau (30; 40; 50; 60 g/l).

Khảo sát ảnh hưởng của nguồn carbohydrate lên quá trình phát sinh phối vô tính lan Hồ điệp từ mô sẹo có khả năng sinh phối

Các cụm mô sẹo có khả năng sinh phối (thu được từ các thí nghiệm tạo mô sẹo) được cấy vào môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l BA; 0,5 mg/l NAA; 1 g/l cao nấm men; 20% nước dừa; 9 g/l agar; 1 g/l than hoạt tính kết hợp với các nguồn carbohydrate khác nhau: sucrose, glucose, lactose, maltose, mannitol, tinh bột (có cùng hàm lượng sử dụng là 40 g/l).

Khảo sát ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy lên khả năng phát sinh hình thái và hình thành tế bào đơn trong nuôi cấy huyền phù tế bào mô sẹo có khả năng sinh phối

Các cụm mô sẹo có khả năng sinh phối (thu được từ các thí nghiệm tạo mô sẹo) được cấy vào môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l BA; 0,5 mg/l NAA; 1 g/l cao nấm men; 20% nước dừa và đặt ở hai điều kiện nuôi cấy (lồng kính và lồng lắc).

Xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại (30 bình nuôi cấy/lần). Số liệu thu nhận được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel®

2010 và phần mềm Statgraphic centurion XV theo phép thử Duncan với $\alpha = 0,05$ (Duncan, 1995).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của mannitol đến sự tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi từ lớp mỏng tế bào cắt dọc PLB lan Hồ điệp

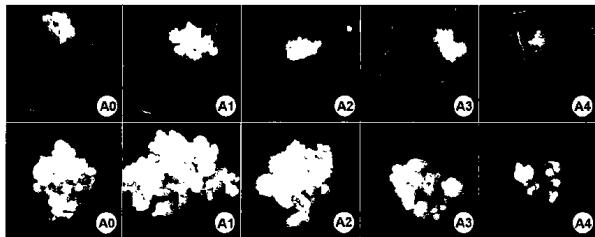
Sau hai tuần nuôi cấy trên môi trường tạo mô sẹo, các ITCL-PLB có hiện tượng phồng lên; đến

tuần thứ ba, mô sẹo bắt đầu xuất hiện phía trên của ITCL-PLB, sau đó các mô sẹo tiếp tục hình thành và gia tăng khối lượng tươi. Khi bổ sung mannitol với nồng độ thấp (10 g/l) vào môi trường nuôi cấy thì khả năng hình thành mô sẹo từ ITCL-PLB tốt nhất và lượng mô sẹo hình thành nhiều nhất (503,8 mg/mẫu). Khi tiếp tục tăng nồng độ mannitol lên 40 g/l thì khả năng hình thành mô sẹo kém dần, khối lượng tươi của mô sẹo cũng giảm dần và thấp nhất ở nghiệm thức bổ sung 40 g/l mannitol (201,9 mg/mẫu) (Bảng 1, Hình 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của mannitol đến sự tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi từ ITCL-PLB lan Hồ điệp.

Nồng độ mannitol	(g/l)	Khối lượng tươi (mg/mẫu)	Khối lượng khô (mg/mẫu)
0		232,9c	142,5c
10		503,8a	137,0d
20		283,2b	195,9a
30		248,4bc	169,8b
40		201,9d	131,4d

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số liệu giá trị trung bình cùng ký tự a, b thì không có sự khác biệt về mặt thống kê. Các mẫu tự khác nhau (a, b, ...) chỉ sự sai khác thống kê với $\alpha = 0,05$.



Hình 1. Ảnh hưởng của mannitol đến sự tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi từ ITCL-PLB. A0; A1, A2, A3; A4 tương ứng với nồng độ mannitol 0; 10; 20; 30; 40 g/l.

Mannitol thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với vai trò tương tự như chất tạo stress áp suất thẩm thấu và trao đổi chất trong nuôi cấy mô cây gỗ (George, 1993). Mannitol ở nồng độ cao có thể gây hại và gây chết thực vật. Sarkar và Naik (1998) báo cáo rằng mannitol ở nồng độ 2 – 4% có thể tăng tỷ lệ sống sót của chất mầm bảo quản *in vitro*. Tuy nhiên, mỗi loài thực vật lại thích hợp với

nồng độ mannitol khác nhau. Mannitol với nồng độ 2 – 4% không thích hợp cho nhân giống *in vitro* cây *Podopyllum peltatum* (Lata *et al.*, 2010). Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy, việc bổ sung mannitol ở nồng độ thấp (10 g/l) có tác dụng kích thích sự tạo mô sẹo từ ITCL-PLB lan Hồ điệp. Khi tăng nồng độ mannitol dẫn đến giảm khối lượng tươi của mô sẹo hình thành, nhưng khối lượng khô của

chúng lại tăng. Khi tăng áp suất thẩm thấu, tế bào cũng có phản ứng lại với môi trường bằng cách tích lũy một lượng chất khô cao hơn để cân bằng áp suất thẩm thấu giữa bên trong và bên ngoài tế bào (Steinitz, 1999), điều này lý giải vì sao ở các nghiệm thức nồng độ mannitol cao mẫu có khối lượng khô cao.

Ảnh hưởng của adenine đến sự tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi từ PLB lan Hồ điệp

Kết quả về sự hình thành mô sẹo có khả năng sinh phôi từ ITCL-PLB trên môi trường có bổ sung adenine với nồng độ khác nhau được ghi nhận trong bảng 2. Sau 4 tuần nuôi cấy, các mẫu cấy được cảm ứng tạo mô sẹo màu vàng. Mô sẹo

ban đầu hình thành từ các vết thương, sau đó tiếp tục hình thành ở các vị trí khác và gia tăng khối lượng tươi. Tùy từng nghiệm thức mà tỷ lệ hình thành mô sẹo có sự khác nhau. Kết quả thí nghiệm cho thấy, việc bổ sung adenine vào môi trường nuôi cấy có tác động tích cực đến sự tạo mô sẹo từ các PLB. Sự gia tăng nồng độ adenine ở một giới hạn thích hợp có mối tương quan thuận với sự gia tăng khối lượng tươi và khối lượng khô của mô sẹo. Việc bổ sung 3 mg/l adenine vào môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự tạo mô sẹo từ PLB, khối lượng tươi của mô sẹo tăng gấp 4,8 lần, khối lượng khô tăng gấp 5,8 lần so với nghiệm thức đối chứng và tỷ lệ hình thành mô sẹo đạt 95,33% (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của adenine đến sự tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi từ PLB lan Hồ điệp.

Nồng độ adenin (mg/l)	Khối lượng tươi (mg/mẫu)	Khối lượng khô (mg/mẫu)	Số PLB (PLB/mẫu)	Tỷ lệ mô sẹo (%)
0	364,7d	133,7d	25,33a	7,33e
1	799,9bc	380,0c	18,67b	16,67d
2	1081,9b	574,0b	7,67c	70,67b
3	1747,8a	769,1a	6,00c	95,33a
4	632,7c	251,4d	14,00bc	34,67c

Ghi chú. Trong cùng một cột, các số liệu giá trị trung bình cùng ký tự a, b, c,.... thì không có sự khác biệt về mặt thống kê. Các mẫu tự khác nhau (a, b, c,....) chỉ sự sai khác thống kê với $\alpha = 0,05$.

Mô sẹo là cụm tế bào không phân hóa, có đặc tính phân chia mạnh, thường được tạo ra do những biến đổi trong quá trình tạo cơ quan. Do đó, các phần non của cơ thể thực vật (mô phân sinh ngọn, thân, rễ,...) dễ hình thành mô sẹo trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* dưới tác động của một auxin mạnh (như 2,4-D) được sử dụng riêng rẽ hay kết hợp với auxin khác hoặc với cytokinin. Adenine là một purine, hoạt động điều hòa tăng trưởng thực vật, adenine lần đầu tiên được ghi nhận bởi Bonner và Haagen-Smit (1939). Việc bổ sung adenine vào môi trường nuôi cấy để cải thiện sự tăng trưởng của mẫu cấy (Nwankwo, Krikorian, 1983) hoặc hỗ trợ cho cytokinin, người ta chỉ nhận thấy tác động có lợi khi bổ sung kết hợp adenine với cytokinin khác như kinetin hoặc BA. Trong sự hiện diện của các cytokinin khác, adenine thường thúc đẩy sự hình thành chồi bất định gián tiếp từ mô sẹo (Beach, Smith, 1979; Xiang *et al.*, 1989), hoặc trực tiếp từ mẫu cấy (Ziv *et al.*, 1970; Rao, Bapat, 1978). Tác dụng có lợi từ adenine khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy là có chứa cả ammonium nitrate và cytokinin (Seabrook *et al.*, 1976; Pyott, Converse, 1981).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, adenine ở nồng độ 3 mg/l thích hợp cho việc tạo mô sẹo của lan Hồ điệp. Khi tiếp tục tăng nồng độ adenine thì quá trình phát sinh mô sẹo bị ức chế, dẫn đến tỷ lệ tạo mô sẹo thấp. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trên đối tượng *Cichorium intybus* L. (Nandagopal, Kumari, 2006); môi trường MS bổ sung 6,66 μM BAP kết hợp với 2,852 μM IAA và 1,36 μM adenine cho tỷ lệ phát sinh mô sẹo là 94,3% sau 30 ngày nuôi cấy, nếu môi trường không bổ sung adenine thì tỷ lệ phát sinh mô sẹo thấp chỉ đạt 32 - 52%. Đối với cây *Thuera peruviana* (Pers.) Schum, trên môi trường MS có bổ sung 1 mg/l kinetin, 2 mg/l 2,4-D và 0,25 mg/l adenine cho tỷ lệ tạo rễ từ mô sẹo là 72% sau 30 ngày nuôi cấy (Garima, Amla, 2010). Các báo cáo khác cũng cho thấy, adenine rất hữu ích trong cảm ứng của chồi *Chlorophytum arundinacearum* (Sanghamitra, Satyabrah, 2011). Adenine đã được chứng minh là có hiệu quả tốt nhất cho sự biệt hóa chồi ở loài *Melia azedarach* L. (Hussain, Anis, 2009).

Ảnh hưởng của môi trường khoáng và sucrose lên quá trình phát sinh phôi vô tính lan Hồ điệp từ mô sẹo có khả năng sinh phôi

Kết quả về sự hình thành phôi vô tính trên các môi trường khoáng và sucrose ở các nồng độ khác nhau được ghi nhận trong bảng 3. Sau 3 tuần nuôi cấy, các cụm mô sẹo có màu vàng đậm chuyển sang màu vàng nhạt, xuất hiện các cấu trúc phôi hình cầu tròn láng; đến tuần thứ 8, sự tăng sinh phôi rõ rệt và rất khác nhau ở các môi trường có thành phần khoáng và nồng độ sucrose khác nhau. Môi trường MS có bổ sung 40 g/l sucrose có sự gia tăng khối lượng tươi (3192,5 mg) và khối lượng khô (1789,8 mg) cao hơn các nồng độ khác (Bảng 3).

Trên môi trường MS không bổ sung khoáng đa lượng kết hợp với sucrose ở các nồng độ khác nhau thì mẫu cấy có sự phát sinh hình thái khác nhau. Mô sẹo tạo phôi mạnh ở nồng độ đường 30 g/l. Nếu tiếp tục tăng nồng độ đường thì sự tạo phôi giảm. Nhìn chung, kích thước các dạng hình thái của mô sẹo có khả năng tạo phôi là rất nhỏ, rời rạc và xộp hơn so với chúng trên môi trường MS. Như vậy, khi không bổ sung khoáng đa lượng thì sucrose ở nồng độ 30 g/l cho kết quả tốt nhất cho quá trình tạo phôi với tỷ lệ phôi là 95,67% (Bảng 3, Hình 2).

Trên môi trường ½MS kết hợp với sucrose ở nồng độ 30 g/l cho sự hình thành phôi đạt tốt nhất, phôi có màu vàng nhạt cho đến vàng sáng, kích thước đồng đều. Khi tăng dần nồng độ sucrose thì khả năng phát sinh phôi giảm dần (Bảng 3, Hình

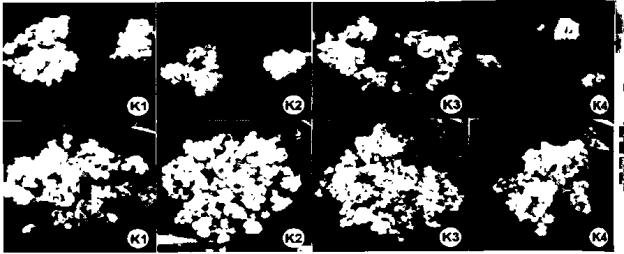
3). Điều đó cho thấy, trên môi trường có hàm lượng khoáng đa lượng giảm đi một nửa (chủ yếu là giảm hàm lượng nitrogen) thì phù hợp cho việc phát sinh phôi từ mô sẹo (Nhựt, 2011). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như nghiên cứu của Ling và đồng tác giả (2007) ở đối tượng *P. amabilis* và cho thấy trên môi trường ½MS bổ sung 30 g/l sucrose hiệu quả tạo mô sẹo có khả năng phát sinh phôi cao hơn so với các nồng độ 40 và 50 g/l. Như vậy, việc giảm khoáng đa lượng trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng tích cực tới quá trình phát sinh phôi và nhân nhanh phôi của lan Hồ điệp.

Sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS, sự hình thành phôi từ mô sẹo đạt tốt nhất khi có bổ sung 40 g/l sucrose. Sau đó nếu tiếp tục tăng nồng độ sucrose thì tỷ lệ phát sinh phôi giảm đi (Bảng 3, Hình 4). Điều này có thể do nồng độ đường 40 g/l tạo áp suất thẩm thấu thích hợp cho quá trình phát triển của phôi cũng như cung cấp đủ năng lượng cho quá trình tăng trưởng của phôi (Nhựt, 2009). Ở các nồng độ đường khác thì quá trình phát sinh phôi bị hạn chế, nồng độ đường càng cao thì số lượng phôi tạo thành càng ít, một số mẫu ở các nghiệm thức có nồng độ đường cao thì mô sẹo có thể bị chết sau khoảng 3 - 4 tuần nuôi cấy. Vấn đề này có thể do ở nồng độ đường cao đã tạo ra áp suất thẩm thấu lớn, làm tế bào mất nước, không hấp thụ được chất dinh dưỡng, do đó mô sẹo chết dần. Như vậy, đối với môi trường MS việc bổ sung 40 g/l sucrose là tối ưu nhất cho sự hình thành phôi.

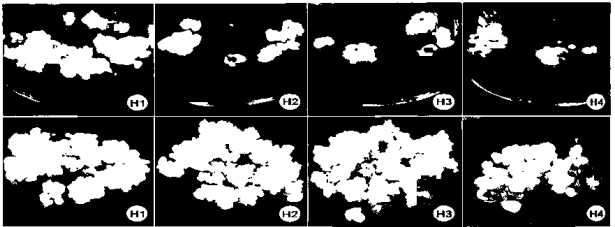
Bảng 3. Ảnh hưởng của môi trường khoáng và sucrose lên quá trình phát sinh phôi vô tính lan Hồ điệp từ mô sẹo có khả năng sinh phôi

Môi trường khoáng	Sucrose (g/l)	Khối lượng tươi (mg/mẫu)	Khối lượng khô (mg/mẫu)	Số PLB (PLB/mẫu)	Tỷ lệ phôi (%)
MSO	30	2053,8c	1073,4c	9,00b	95,67a
	40	1696,4d	762,7d	3,33c	91,33b
	50	1130,8e	476,3e	1,67c	43,67d
	60	354,2g	133,9f	0,67c	4,67e
½MS	30	2305,7bc	1152,2c	15,00a	94,67a
	40	1862,8d	806,7d	16,67a	84,00bc
	50	671,6fg	276,8ef	17,67a	73,67c
	60	392,1g	121,3f	12,67ab	47,33e
MS	30	2949,3bc	1500,7b	17,00a	94,33ab
	40	3192,5a	1789,8a	18,67c	95,33a
	50	2084,8c	917,7cd	14,67c	73,67c
	60	523,1fg	238,6ef	18,33c	37,00d

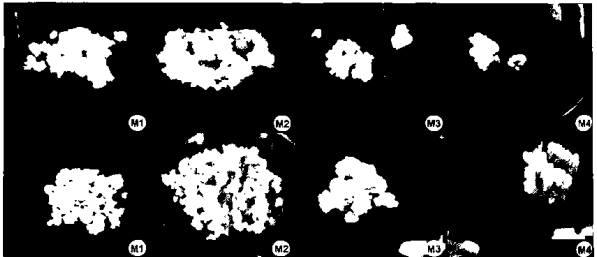
Ghi chú: Trong cùng một cột, các số liệu giá trị trung bình cùng kí tự a, b, c, ... thì không có sự khác biệt về mặt thống kê. Các mẫu tự khác nhau (a, b, c, ...) chỉ sự sai khác thống kê với $\alpha = 0,05$



Hình 2. Ảnh hưởng của môi trường không bổ sung khoáng kết hợp với sucrose lên quá trình phát sinh phôi; K1; K2; K3; K4 tương ứng với nồng độ sucrose 30, 40, 50, 60 g/l



Hình 3. Ảnh hưởng của môi trường 1/2 MS kết hợp với sucrose lên quá trình phát sinh phôi; H1; H2; H3; H4 tương ứng với nồng độ sucrose 30; 40; 50; 60 g/l.



Hình 4. Ảnh hưởng của môi trường MS kết hợp với sucrose lên quá trình phát sinh phôi; M1; M2; M3; M4 tương ứng với nồng độ sucrose 30, 40, 50; 60 g/l

Ảnh hưởng của nguồn carbohydrate lên quá trình phát sinh phôi vô tính lan Hồ điệp từ mô sẹo có khả năng sinh phôi

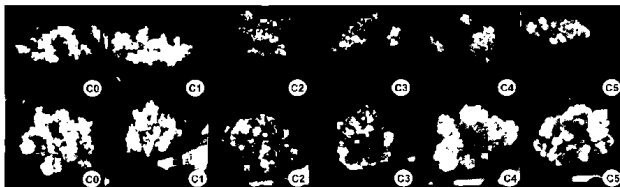
Các cụm mô sẹo có khả năng sinh phôi được cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 1 g/l cao nấm men, 20% nước dừa, 9 g/l agar, 1 g/l than hoạt tính và các nguồn carbohydrate (sucrose, glucose, lactose, maltose, mannitol và tinh bột). Sau 4 tuần nuôi cấy, mô sẹo bắt đầu cảm ứng với môi trường nuôi cấy, gia tăng kích thước và có

sự phát sinh hình thái khác nhau ở các nghiệm thức bổ sung các nguồn carbohydrate khác nhau. Trong các nguồn carbohydrate được khảo sát, glucose cho kết quả tốt nhất cho quá trình phát sinh phôi vô tính lan Hồ điệp, sự gia tăng khối lượng tươi (5623,7 mg) và khối lượng khô (2124,3 mg) đạt cao nhất (Bảng 4, Hình 5). Ở các nghiệm thức bổ sung mannitol, maltose, các mô sẹo trải qua giai đoạn phát triển phôi rất ngắn, rồi nhanh chóng phát triển thành PLB. Còn nghiệm thức bổ sung lactose và tinh bột không ghi nhận được sự hình thành phôi.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nguồn carbohydrate lên quá trình phát sinh phôi vô tính lan Hồ điệp từ mô sẹo có khả năng sinh phôi.

Nguồn carbohydrate	Khối lượng tươi (mg/mẫu)	Khối lượng khô (mg/mẫu)	Số PLB (PLB/mẫu)	Tỷ lệ phôi (%)
Sucrose	3189,7b	1788,2b	17,83c	93,90b
Glucose	5623,7a	2124,3a	14,66c	95,67a
Lactose	666,7d	241,3e	3,33d	-
Maltose	786,6d	319,2d	36,00b	47,33c
Mannitol	739,4d	331,6d	37,33b	44,33c
Tinh bột	971,4c	423,3c	62,00a	

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số liệu giá trị trung bình cùng kí tự a, b, c, ... thì không có sự khác biệt về mặt thống kê. Các mẫu tự khác nhau (a, b, c,...) chỉ sự sai khác thống kê với $\alpha = 0,05$. (-), không có số liệu.



Hình 5. Ảnh hưởng của nguồn carbohydrate lên quá trình phát sinh phôi; C0; C1; C2; C3; C4; C5 tương ứng với các nguồn carbohydrate: sucrose; glucose; lactose; maltose; mannitol; tinh bột.

Đường là một thành phần rất quan trọng trong môi trường nuôi cấy, chúng là nguồn cung cấp carbohydrate. Vì trong môi trường nuôi cấy mô nồng độ CO₂ thấp nên loại và nồng độ đường là cần thiết để thúc đẩy hạt giống nảy mầm và sinh trưởng của cây (Faria *et al.*, 2004). Glucose là dạng đường đơn mà đa phần tế bào sống từ động vật đến thực vật có thể dễ dàng đồng hóa nhất, tế bào có thể hấp thụ trực tiếp mà không cần biến đổi. Đây là một điểm thuận

lợi làm cho các mô sẹo trên môi trường có glucose thì chu kỳ tế bào ngắn, mô sẹo phát triển nhanh, tế bào phân chia mạnh. Chính vì yếu tố này mà glucose cho khả năng tạo phôi và nhân nhanh phôi cao nhất (Nhựt *et al.*, 2009).

Tuy nhiên, khác với kết quả của chúng tôi, khi nghiên cứu ảnh hưởng của các nguồn carbohydrate khác nhau với nồng độ 2; 4; 6; 8% lên sự tăng trưởng

của protocorm loài lan *Grammatophyllum speciosum*, kết quả cho thấy, sau 4 tuần trong môi trường MS lỏng, sucrose, glucose có tác dụng ức chế sự tăng trưởng của protocorm và ở nồng độ 8% của hai loại đường này làm PLB hóa nâu. Ngược lại, sorbitol và mannitol có hiệu quả cho protocorm tái sinh, hai nguồn carbohydrate này có ảnh hưởng tích cực đến sự hình thành của PLB và sự phát triển của PLB thành cây con (Pimsen, Kanchanapoom, 2011). Nghiên cứu của Ling và đồng tác giả (2007) đã chỉ ra rằng trên môi trường có bổ sung sucrose hoặc maltose ở nồng độ bằng nhau thì mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường có chứa maltose sẽ chuyển thành PLB, vấn đề này có thể là do mô sẹo lan Hồ điệp có khả năng đồng hóa maltose và mannitol ở mức độ trung bình, do đó tế bào không đủ năng lượng cung cấp cho hoạt động sống từ đó mô sẹo chuyển sang xanh dần, điều này có thể là do mô sẹo tạo diệp lục tố để tổng hợp thêm đường bằng quang hợp.

Các nguồn carbohydrate ở các nồng độ khác nhau có ảnh hưởng đáng kể đến sự tái sinh của thực vật. Khi nuôi cấy phôi vô tính có nguồn gốc từ lá của cây lan *Oncidium* trên môi trường MS½ có bổ sung fructose, glucose, sucrose và maltose đều hiệu quả cho sự cảm ứng tạo phôi trực tiếp (Hong *et al.*, 2007). Tokuhara và Mii (2003) đã khảo sát ảnh hưởng của nguồn carbohydrate và nồng độ của chúng đến sự hình thành PLB từ huyền phù tế bào của lan Hồ điệp, kết quả cho thấy, glucose là nguồn carbohydrate tốt nhất cho sự tăng sinh PLB, sucrose thích hợp cho sự phát triển mô sẹo và sorbitol thích hợp cho sự phát triển của PLB. Do đó, sự phát triển của PLB từ huyền phù tế bào của lan Hồ điệp có thể được kiểm soát bằng cách thay đổi các loại và nồng độ đường. Nghiên cứu của Pimsen và Kanchanapoom (2011) đã chỉ ra rằng sự tăng trưởng protocorm của *G. speciosum* được tăng cường bởi môi trường MS có bổ sung sorbitol và mannitol,

nồng độ glucose và sucrose cao hơn có tác dụng ức chế quá trình này.

Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy lên khả năng phát sinh hình thái và hình thành tế bào đơn trong nuôi cấy huyền phù tế bào mô sẹo có khả năng sinh phôi

Sau 3 tuần nuôi cấy các mô sẹo xộp, vàng đục đậm trên môi MS lỏng có bổ sung 2 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 30 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính, các mô sẹo xộp chuyển dần sang vàng nhạt, xanh nhạt và bắt đầu định hướng biệt hóa. Lúc đầu tạo phôi vàng nhạt sau đó chuyển sang xanh nhạt, kích thước nhỏ, sang tuần thứ tư phôi xanh đậm dần, gia tăng kích thước và chuyển dần thành PLB có màu xanh nhạt. Tuy nhiên, khả năng biệt sinh của mẫu cây ở hai điều kiện nuôi cấy rất khác nhau. Sau 14 tuần nuôi cấy, kết quả thu nhận được trình bày trong bảng 5, bảng 6.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, trên môi trường nuôi cấy bổ sung các thành phần như nhau thì điều kiện nuôi cấy quyết định khả năng sống sót, sự tăng sinh, phân hóa và biệt hóa mẫu cây. Khi nuôi cấy trên môi trường lỏng tinh cho kết quả tăng sinh, phân hóa và biệt hóa mẫu cây rất thấp; tỷ lệ mẫu chết cao, các tế bào lắng tụ ở đáy bình nuôi cấy. Mật độ tế bào ở những vùng không lắng tụ là rất thấp, không đủ để đạt sự tăng trưởng nhanh và mạnh. Ngược lại, ở những vùng lắng tụ, mật độ lại rất cao, cũng tăng trưởng rất chậm. Mật độ tế bào quá cao làm giảm mức độ tăng trưởng của huyền phù, đây có thể là do sự cạnh tranh dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy (Henshaw *et al.*, 1966; Torres, 1989). Sau một thời gian nuôi cấy, các mô sẹo, các phôi, PLB được tạo ra dần lắng xuống đáy bình nuôi cấy. Sự tăng trưởng của mô sẹo tiếp tục có thể bị ảnh hưởng do chúng bị chìm hoàn toàn trong nước và không chuyển động được.

Bảng 5. Khả năng lắng sinh, phát sinh phôi, PLB và hình thành tế bào đơn trong nuôi cấy huyền phù tế bào mô sẹo.

Điều kiện nuôi cấy	Khối lượng tươi (g/bình)	Số cụm PLB	Số lượng PLB	Tế bào đơn	Đặc điểm
Lỏng lác	10936a	35,29a	5600,59a	Rất nhiều	PLB hình cầu, lớn, xanh tươi, dày sọc sống, nhiều PLB nhỏ, vàng hơi xanh nhạt mọc ra xung quanh các PLB lớn, tăng sinh mạnh.
Lỏng tinh	1963b	9,17b	1024,41b	Rất ít	Kích thước các cụm PLB nhỏ, ít, xanh rất nhạt, hơi vàng nhạt, trắng; tăng sinh rất ít, không tạo nhiều PLB mới, một số chết.

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số liệu giá trị trung bình cùng kí tự a, b, c thì không có sự khác biệt về mặt thống kê. Các mẫu tự khác nhau (a, b, c, ...) chỉ sự sai khác thống kê với $\alpha = 0,05$

Bảng 6. Ảnh hưởng của kiểu nuôi cấy lên tỷ lệ sống sót của mẫu cấy.

Điều kiện nuôi cấy	Tỷ lệ sống sót (%)							
	Thời gian nuôi cấy (tuần)							
	0	2	4	6	8	10	12	14
Lồng lắc	100a	100a	100a	100a	100a	80,37a	50,00a	
Lồng tĩnh	100a	100a	90,21b	80,72b	67,81b	20,00b		

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số liệu giá trị trung bình cùng kí tự a, b, c... thì không có sự khác biệt về mặt thống kê. Các mẫu tự khác nhau (a, b, c,...) chỉ sự sai khác thống kê với $\alpha = 0,05$. (-). Không có số liệu hoặc mẫu bị chết.

Sau 2 tuần nuôi cấy ở điều kiện lồng lắc, các mô sẹo nhanh chóng tách rời nhau và tạo ra nhiều tế bào đơn trong huyền phù nuôi cấy. Quan sát dưới kính hiển vi thì thấy rằng trong huyền phù tế bào có rất nhiều tế bào đơn đang ở các giai đoạn khác nhau; một số tế bào bắt đầu phân chia, một số ở giai đoạn tách rời; ngoài ra, còn có các cụm tế bào có vài chục tế bào. Theo Narayanaswamy (1977), mô sẹo tăng trưởng trên môi trường lồng lắc sẽ hình thành huyền phù gồm các tế bào tự do và tập hợp từ một đến vài trăm tế bào tùy thuộc vào tính bở xộp của nó. Mô sẹo xộp giúp cho việc hình thành các tế bào đơn và cụm tế bào dễ hơn khi nuôi cấy lồng lắc. Vai trò của máy lắc là giúp cho tế bào tăng sinh trong môi trường lỏng (Torres, 1989), giúp cho sự trao đổi khí giữa mẫu cấy và môi trường. Sự chuyển động của môi trường giúp cho các tế bào hay cụm tế bào có thể tiếp xúc và hấp thu chất dinh dưỡng cũng như chịu sự tác động của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật từ mọi phía.

Huyền phù tế bào thu được bao gồm cả các tế bào đặc có nhân to, lẫn các tế bào có không bào rất lớn. Các tế bào có tế bào chất đậm đặc, có nhân to được xem là nguồn nguyên liệu tốt cho các nghiên cứu phát sinh hình thái sau này. Những tế bào này có hàm lượng protein và RNA cao (Torres, 1989). Sự phân tách các cụm tế bào trong huyền phù cũng thay đổi theo thời gian. Khi huyền phù tế bào mới được cấy sang môi trường mới, lượng tế bào đơn quan sát thấy rất cao, ít có cụm tế bào. Như vậy, thời điểm cấy chuyển các phôi và PLB trên môi trường nuôi cấy lồng lắc là khoảng 8 tuần, lúc này các mẫu cấy đạt tỷ lệ tăng sinh tối ưu, cho hiệu quả cao nhất.

KẾT LUẬN

Sự hình thành mô sẹo từ lớp mỏng tế bào của PLB đạt tốt nhất trên môi trường có bổ sung 10 g/l mannitol hoặc 3 mg/l adenine. Môi trường khoáng

MS có bổ sung 40 g/l sucrose thích hợp cho sự phát triển phôi từ mô sẹo. Glucose (40 g/l) là nguồn carbohydrate thích hợp cho nuôi cấy phát sinh phôi. Điều kiện nuôi cấy lồng lắc có ảnh hưởng tích cực lên khả năng phát sinh hình thái và hình thành tế bào đơn trong nuôi cấy huyền phù tế bào mô sẹo có khả năng sinh phôi.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin chân thành cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Lâm Đồng đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arditti J (1992) *Fundamentals of Orchid Biology*. John Wiley and Sons. New York, USA
- Beach KH, Smith RR (1979) Plant regeneration from callus of red and crimson clover. *Plant Sci Lett* 16: 231-237.
- Belarmino MM, Mui M (2000) Agrobacterium-mediated genetic transformation of a *Phalaenopsis* orchid. *Plant Cell Rep* 19: 435-442.
- Bonner DM, Haagen-Smit AJ (1939) Leaf growth factors II. The activity of pure substances in leaf growth. *Proc Nat Acad Sci USA* 25: 184-188.
- Da Silva JAT (2003) Thin cell layer technology for induced response and control of rhizogenesis in *Chrysanthemum*. *Plant Growth Regul* 39: 67-76.
- Duncan DB (1995) Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11(1): 1-5
- Dương Tấn Nhựt (2011) *Công nghệ sinh học thực vật: nghiên cứu cơ bản và ứng dụng*. NXB Nông nghiệp.
- Dương Tấn Nhựt, Hồng Ngọc Trâm, Nguyễn Phúc Huy, Đinh Văn Khiêm (2009) Ảnh hưởng của nước dừa và sucrose lên sự tăng sinh mô sẹo và sự hình thành phôi vô tính ở loài lan Hồ điệp *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume. *Tap chí Sinh học* 31(1): 77-84.
- Faria RT, Rodrigues FN, Oliveira LVR, Muller C (2004) *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. *Hort Brasileria* 22: 780-783.

- Garima Z, Amla B (2010) Effect of adeninesulphate on organogenesis via leaf culture in an ornamental plant: *Thevetia peruviana* (Pers.) Schum. *Int J Pharma Bio Sci* 1(2): 1-9.
- George EF (1993) *Plant propagation by tissue culture*. 2nd ed. Exegetic Edington 547p.
- Henshaw GG, Jha KK, Mehta AR, Shakeshaft DJ, Street HE (1966) Studies on the growth in culture of plant cells. I. Growth patterns in batch propagated suspension cultures. *J Exp Bot* 17: 362-377.
- Hong PI, Chen JT, Chang WC (2007) Promotion of direct somatic embryogenesis of *Oncidium* by adjusting carbon sources. *Biol Plant* 52(3): 597-600.
- Hussain MK, Anis M (2009) Rapid *in vitro* multiplication of *Melastoma azedarach* L. (a multipurpose woody tree). *Acta Physiol Plant* 31(4): 765-772.
- Ichihashi S (1992) Micropropagation of *Phalaenopsis* through the culture of lateral buds from young flower stalks *Lindleyana* 7. 208-215
- Intuwong O, Sagawa Y (1974) Clonal Propagation of *Phalaenopsis* by shoot tip culture *Bulletin Amer Orchid Soc* 54: 893-895.
- Ishii Y, Takamura T, Goi M, Tanaka M (1998) Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Rep* 17: 446-450.
- Lata H, Moraes RM, Bertoni B, Pereira MMS (2010) *In vitro* germlasm conservation of *Podophyllum peltatum* L. under slow growth conditions. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 46: 22-27
- Le BV, Hang Phuong NT, Anh Hong LT, Van KTT (1999) High frequency shoot regeneration from *Rhynchostylis gigantea* (Orchidaceae) using thin cell layer. *Plant Growth Regul* 28: 179-185.
- Ling ACK, Yap CP, Mohd J, Shaib, Vilasini P (2007) Induction and morphogenesis of *Phalaenopsis* callus. *J Trop Agr Fd Sc* 35(1): 147-152.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol* 15: 473-479.
- Nandagopal S, Kumari BDR (2006) Adenine sulphate induced high frequency shoot organogenesis in callus and *in vitro* flowering of *Cochorum intybus* L. cv. Focus - a potent medicinal plant. *Acta Agr Slovenica* 87(2): 415-425.
- Narayanaswamy S (1977) *Regeneration of plants from tissue cultures*. In Reinert J, Bajaj YPS, eds. *Plant cell, tissue, and organ culture*. Springer-Verlag, Berlin, Germany: 179-206.
- Nhut DT, Le BV, Van KTT (2001) Manipulation of the morphogenetic pathways of *Lilium longiflorum* transverse thin cell layer explants by auxin and cytokinin. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37: 44-49
- Nwankwo BA, Krikorian AD (1983) Morphogenetic potential of embryo and seedling derived callus of *Blatta guineensis* Jacq. var. *pisifera* Becc. *Ann Bot* 51: 65-76.
- Pimsen M, Kanchanapoom K (2011) Effect of basal media and sugar types on *in vitro* regeneration of *Grammatophyllum speciosum* Blume. *Not Sci Biol* 3(3): 101-104.
- Pyott JL, Converse RH (1981) *In vitro* propagation of heat treated red raspberry clones. *Hort Sci* 16: 308-309.
- Rao PS, Bapat VA (1978) Vegetative propagation of sandalwood plants through tissue culture. *Can J Bot* 56: 1153-1156.
- Reuter E (1983) The importance of propagating *Phalaenopsis* by tissue culture. *Orchid Review* 91: 199-201.
- Sajise JU, Sagawa Y (1991) Regeneration of plantlets from callus and protoplasts of *Phalaenopsis* sp. *Malaysi Orchid Bull* 5: 23-28.
- Sanghamitra S, Satyabrata M (2011) Factors influencing rapid clonal propagation of *Chlorophytum arundinaceum* (Liliaceae: Liliaceae), an endangered medicinal plant. *Int J Trop Biol* 59(1): 435-445.
- Sarkar D, Naik PS (1998) Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants *in vitro*. *Euphytica* 102: 275-280.
- Seabrook JEA, Cumming BG, Dionnel LA (1976) The *in vitro* induction of adventitious shoot and root apices on *Narcissus* (daffodil and narcissus) cultivar tissue. *Can J Bot* 54: 814-819.
- Steinitz (1999) Sugar alcohols display nonosmotic roles in regulating morphogenesis and metabolism in plants that do not produce polyols as primary photosynthetic products. *J Plant Physiol* 155: 1-8.
- Tanaka M (1987) Studies on the clonal propagation of *Phalaenopsis* through *in vitro* culture. Memoir. Faculty of Agriculture. *Kagawa Uni Japan* 49: 1-85.
- Tokuhara K, Mii M (1993) Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Rep* 13: 7-11.
- Tokuhara K, Mii M (2001) Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *In vitro Cell Dev Biol Plant* 37: 457-461.
- Tokuhara K, Mii M (2003) Highly efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Phalaenopsis* orchid by adjusting carbohydrate sources. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 39: 635-639
- Torres KC (1989) *Overview of cell suspension culture*. In Torres KC, ed. *Tissue culture techniques for horticultural crops*. Chapman & Hall Publisher. The USA: 151-160.

Xiang-Can Z, Jones DA, Kera A (1989) Regeneration of shoots on root explants of flax *Ann Bot* 63: 297-299

Ziv M, Halevy H, Shilo R (1970) Organ and plantlets regeneration of gladiolus through tissue culture. *Ann Bot* 34: 671-676.

EMBRYOGENIC CALLUS INDUCTION FOR SOMATIC EMBRYOGENESIS AND CELL SUSPENSION CULTURES OF *PHALAEOPSIS AMABILIS*

Trinh Thi Lan Anh¹, Nguyen Quoc Hieu², Nguyen Thi Kim Loan³, Nguyen Thanh Sang³, Hoang Thanh Tung³, Vo Thi Bach Mai¹, Duong Tan Nhut³

¹Ho Chi Minh City University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh City

²Ho Chi Minh City University of Technology, Ho Chi Minh City

³Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

In the present study, the influence of factors on embryogenic callus induction, somatic embryogenesis and cell suspension culture of *Phalaenopsis* were investigated. Flower stalk was exploited for setting aseptic culture. Protocorm like bodies obtained from in vitro leaves were used as plant material for embryogenic callus induction. The results indicated that the best callus formation was recorded when PLB longitudinal Thin Cell Layer (ITCL) explants were cultured on medium containing 10 g/l mannitol, and PLB ITCL explants cultured on medium supplemented with 3 mg/l adenine gave the highest callus induction rate. Callus clumps then were sub-cultured in order to examine somatic embryogenesis and cell suspension culture. Medium formulation and sucrose concentration affected the somatic embryogenesis, and Murashige and Skoog (MS) medium with 40 g/l sucrose showed to be the most suitable medium for this process. Among carbohydrate sources (including sucrose, glucose, lactose, maltose, mannitol and starch) were added into the media at the concentration of 40 g/l, glucose was found to be the best for somatic embryogenesis. In addition, liquid shaking culture was also effective for cell suspension culture of *Phalaenopsis*. The present results are significant in the respect of application of somatic embryogenesis and cell suspension culture in high potential micropropagation of *Phalaenopsis*.

Keywords: cell suspension culture, embryogenic callus, *Phalaenopsis amabilis*, protocorm-like body, somatic embryogenesis