

STUDY ON *IN VITRO* PROPAGATION OF *Dendrobium asomum* Lindl. DISTRIBUTE IN THAI NGUYEN PROVINCE

Nguyen Thi Hai Yen*, Nguyen Thu Huong

TNU - University of Sciences

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 08/4/2021 Revised: 23/5/2021 Published: 28/5/2021	This study aims to investigate influential factors to species <i>Dendrobium asomum</i> Lindl. <i>in vitro</i> propagation such as protocorm regeneration, shoot growth, development, rooting, the survival and growth of seedlings were investigated. Results showed that Murashige and Skoog medium supplemented including 10 gL⁻¹ sucrose; 1 gL⁻¹ activated charcoal; 0,2 mgL⁻¹ NAA; 2 mgL⁻¹ BAP were the best for protocorm regeneration. A suitable medium for the growth and development of <i>Dendrobium amosum</i> Lindl. shoots <i>in vitro</i> was Murashige and Skoog medium supplemented including 25 gL⁻¹ sucrose; 1 gL⁻¹ activated charcoal; 1 mgL⁻¹ BAP and 50 gL⁻¹ potato. Additional volume of 0.5 mgL⁻¹ NAA to the culture medium promoted the best root formation (root length up to 5.1 mm, number of roots/shoot reaching 3.0 after 80 days, long strong roots). Seedlings grown in a mesh house on the condition of forest moss was suitable, supporting the first stage plants with ½ MS solution for good results (rate of living plants reaching 95%; strong trees with many roots, newly shoots grows well).
KEYWORDS <i>Dendrobium asomum</i> Lindl. <i>In vitro</i> propagation Protocorm Thai Nguyen Forest moss	

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* LAN HOÀNG THẢO PHI ĐIỆP TÍM (*Dendrobium asomum* Lindl.) PHÂN BỐ TẠI THÁI NGUYÊN

Nguyễn Thị Hải Yến*, Nguyễn Thu Hương

Trường Đại học Khoa học - ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 08/4/2021 Ngày hoàn thiện: 23/5/2021 Ngày đăng: 28/5/2021	Trong nghiên cứu này, các yếu tố ảnh hưởng đến sự phát sinh protocorm, tái sinh và phát triển chồi, tạo cây hoàn chỉnh trong nuôi cấy <i>Dendrobium asomum</i> Lindl. <i>in vitro</i> đã được khảo sát. Kết quả cho thấy môi trường Murashige & Skoog bổ sung 10g L⁻¹ sucrose; 1g L⁻¹ than hoạt tính; 0,2 L⁻¹ NAA /l và 2 mg L⁻¹ BAP thích hợp cho sự phát sinh protocorm từ hạt; Môi trường thích hợp cho sinh trưởng và phát triển chồi <i>D. asomum</i> Lindl. <i>in vitro</i> là MS bổ sung 25g L⁻¹ saccharose; 6g L⁻¹ agar; 1g L⁻¹ than hoạt tính; 1g L⁻¹ BAP và khoai tây 50g/l. Bổ sung NAA nồng độ 0,5 mg/l vào môi trường nuôi cấy kích thích sự hình thành và phát triển rễ tốt nhất (độ dài rễ đạt 5,1 mm, số rễ trung bình/chồi đạt 3,0 sau 80 ngày; rễ mập, dài khỏe). Giá thể rêu rừng phù hợp để ra cây con <i>in vitro</i>, chăm sóc cây giai đoạn đầu bằng dung dịch ½ MS cho kết quả tốt (tỷ lệ cây sống đạt 95%; cây to khỏe ra rễ nhiều, mầm mới phát sinh khỏe).
TỪ KHÓA Hoàng thảo phi điệp Tái sinh <i>in vitro</i> Protocorm Thái Nguyên Rêu rừng	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4286>

* Corresponding author. Email: yennth@tnus.edu.vn

1. Giới thiệu

Dendrobium (Lan Hoàng thảo) là một chi có số lượng loài lớn nhất trong họ Lan. Trên thế giới khoảng 1400 loài, phân bố chủ yếu ở Đông Nam Á và một số đảo thuộc Philippine, Malaysia, Indonesia, Papua New Guinea, Đông Bắc Australia. Ở Việt Nam, chi này có 107 loài và 1 thứ, phân bố ở hầu khắp cả nước từ Bắc vào Nam trên các vùng núi và một số đảo ven biển [1].

Nhiều loài trong chi Hoàng thảo ngoài tác dụng trang trí cho không gian sống còn có giá trị dược liệu. Hoàng thảo thạch斛 tía (*D. officinale* Kimura et Migo) nổi tiếng với nhiều tác dụng và được xem là cây thuốc quý, được dùng hỗ trợ điều trị lao, sốt, đau họng, nóng trong, đau lưng, ra mồ hôi trộm, đau dạ dày, thiếu năng sinh dục ở nam giới, viêm ruột [2] - [4]; Lan Hoàng thảo phi điệp (*D. anosmum* Lindl.), Hoàng thảo Đùi gà (*D. nobile* Lindl.) được dân gian sử dụng trị các chứng suy nhược cơ thể, thần kinh, đau họng và yếu sinh lý ở nam giới...

Hoàng thảo phi điệp tím (*Dendrobium anosmum* Lindl.) là loài lan rừng rất đẹp, được ưa thích nhất hiện nay. Hoàng thảo phi điệp phân bố rộng rãi ở hầu hết các vùng trong cả nước, với nhiều biến thể được gọi tên vùng miền, thích nghi với khí hậu khác nhau. Phi điệp Thái Nguyên được coi là một dòng quý hiếm bởi thân lá hoa to đẹp, mùi hương thơm đặc trưng với khả năng sinh trưởng rất tốt. Những năm qua, loài lan rừng này đang bị khai thác quá mức có nguy cơ cạn kiệt trong tự nhiên, do nhu cầu chơi hoa cũng như nhu cầu thu hái làm thuốc tăng cao. Tình trạng khai thác không kiểm soát đối với phi điệp nói riêng và lan rừng nói chung đang xảy ra mạnh ở nhiều nơi như Tây Nguyên, Lâm Đồng và các tỉnh phía Bắc như Hà Giang, Yên Bái, Thái Nguyên... Hiện nay, hầu hết các loài lan rừng Việt Nam đều đã được xếp vào danh mục sách đỏ cần bảo vệ, trong đó có nhiều loài đang ở mức độ đặc biệt nguy cấp [5]. Vì vậy việc bảo tồn nguồn gen tự nhiên là rất cần thiết. Trong môi trường sinh thái, lan nhân giống chủ yếu bằng hình thức sinh sản vô tính (đẻ chồi hàng năm), nhưng hệ số nhân giống thấp. Mặc dù quả lan có rất nhiều hạt nhưng trong tự nhiên lại khó nảy mầm vì không chứa nội nhũ, để nảy mầm được phải có sự cộng sinh của một số loại nấm phù hợp [6].

Cùng với sự phát triển của công nghệ sinh học, việc nhân giống *in vitro* được xem là phương pháp hiệu quả để nhân nhanh và bảo tồn nhiều loài lan quý hiếm. Cho đến nay trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu vi nhân giống chi *Dendrobium*, trong đó nghiên cứu về nhân giống các loài *Dendrobium* lại chiếm tỉ lệ cao nhất (26,4%), tiếp đến là các loài Thạch斛 làm thuốc (*D. candidum*, *D. officinale*) (10,3%) và thấp nhất là một số loài lan rừng gồm *D. primulinum*, *D. luteiflorum*, *D. densiflorum*, *D. crumenatum* (2,3%) [7], *D. chrysanthum* [8]. Ở Việt Nam, nhân giống *Dendrobium* đã được tiến hành trên một số loài như: *D. officinale* Kimura et Migo [9]; *D. luteiflorum* [10], *D. heterocarpum* Lindl [11], các nghiên cứu nhân giống còn hạn chế trong quy mô phòng thí nghiệm, chưa đưa ra cây giống phục vụ thương mại và bảo tồn. Để góp phần bảo tồn và cung cấp giống cho thị trường hoa lan rừng, chúng tôi tiến hành nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài lan Hoàng thảo Phi điệp tím (*D. anosmum* Lindl.) phân bố ở Thái Nguyên.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Mẫu hoàng thảo phi điệp tím (*D. anosmum* Lindl.) được thu tại huyện Võ Nhai – Thái Nguyên. Quả được thu vào tháng 10, 11. Chọn từ những quả to chắc, còn xanh chưa mở hạt, không bị bệnh, vỏ quả lành lặn. Quả sau khi thu thập được bảo quản ở ngăn mát của tủ lạnh hoặc nơi thoáng mát, sử dụng trong khoảng 10 ngày.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phương pháp khử trùng mẫu

Mẫu được tiến hành khử trùng qua các bước: (1) Rửa sạch bằng nước xà phòng loãng; (2) khử trùng bằng cồn 70% trong 30 giây rồi lắc trong thủy ngân clorua ($HgCl_2$) với thời gian từ 13 - 15 phút;

(3) Tráng lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng; (4) Quả được thấm khô trên giấy thấm, tách hạt và rắc lên môi trường nuôi cấy (MS bổ sung 10 g/l sucrose, than hoạt tính 1 g/l, NAA 0,2 mg/l và BAP với nồng độ thay đổi) để bình nuôi dưới giàn đèn cường độ 2000 lux trong điều kiện nhiệt độ phòng nuôi.

2.2.2. Tái sinh chồi từ protocorm và tạo cây hoàn chỉnh

Môi trường nuôi cấy sử dụng trong các thí nghiệm là môi trường nền MS [12]. Sử dụng đường saccharose làm nguồn cung cấp cacbon. Chất điều hòa sinh trưởng gồm BAP, kinetin và NAA; các chất bổ sung như nước dừa, dịch chiết chuối và khoai tây; chất độn gồm agar và than hoạt tính. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH = 5,8 và được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm, trong 20 min.

Nghiên cứu ảnh hưởng của BAP đến khả năng tái sinh chồi từ protocorm: Môi trường nuôi cấy sử dụng là MS với các thành phần cơ bản, bổ sung thêm NAA 0,2 mg/l và BAP với nồng độ thay đổi ở 4 công thức 0; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l.

Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh, phát triển của chồi từ protocorm

- Thí nghiệm 1: Nghiên cứu ảnh hưởng của BAP đến sự tái sinh chồi từ protocorm. Tách các cụm protocorm cây chuyển vào môi trường MS cơ bản bổ sung nước dừa 50ml/l; than hoạt tính 1 g/l, NAA 0,2 mg/l và BAP với nồng độ thay đổi ở bốn công thức thí nghiệm: CT1- 0; CT2- 1,0 mg/l; CT3 - 1,5 mg/l; CT4 - 2,0 mg/l.

- Thí nghiệm 2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhóm cytokinin (BAP, kinetin) đến sự phát triển chồi Lan Hoàng thảo phi điệp tím. Thí nghiệm tiến hành trên 7 công thức, mỗi công thức cấy 3 bình, 5 cụm chồi/bình, thí nghiệm 3 lần nhắc lại. Đối chứng (ĐC): MS + sucrose 30 g/l + agar 6 g/l + nước dừa 100 ml/l + THT 1 g/l; CT1: ĐC + BAP 0,5 mg/l; CT2: ĐC + BAP 1,0 mg/l; CT3: ĐC + BAP 1,5 mg/l; CT4: ĐC + kinetin 0,5 mg/l; CT5: ĐC + kinetin 1,0 mg/l CT6: ĐC + kinetin 1,5 mg/l.

- Thí nghiệm 3. Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng khoai tây và chuối xanh đến sự nhân nhanh cụm chồi Lan Hoàng thảo phi điệp tím. Thí nghiệm tiến hành trên 5 công thức ĐC: MS + sucrose 30 g/l + agar 6 g/l + nước dừa 100 ml/l + THT 1 g/l + BAP 1,5 mg/l; CT1: ĐC + chuối xanh 30 g/l; CT2: ĐC + chuối xanh 50 g/l; CT3: ĐC + khoai tây 30 g/l; CT4: ĐC + khoai tây 50 g/l.

Nghiên cứu ảnh hưởng của NAA đến sự hình thành rễ tạo cây hoàn chỉnh

Thí nghiệm tiến hành trên 4 công thức: ĐC: MS + sucrose 30 g/l + agar 6 g/l + nước dừa 100 ml/l + THT 1 g/l + khoai tây 50 g/l; CT1: ĐC + NAA 0,2 mg/l; CT2: ĐC + NAA 0,5 mg/l; CT3: ĐC + NAA 0,7 mg/l.

2.2.3. Phương pháp ra cây ngoài vườn ươm

Khi cây con nuôi cấy đã đạt đủ tiêu chuẩn, tiến hành ra cây để trồng trong vườn ươm. Giá thể sử dụng để trồng cây con là rêu rừng đã được xử lý với chất diệt nấm. Cây con được chăm sóc với các chế phẩm dinh dưỡng khác nhau. Thí nghiệm tiến hành trên 3 công thức; CT1: Phun tưới nước lã; CT2: Phun tưới $\frac{1}{2}$ MS; CT3: Phun tưới phân đầu trâu 501. Mỗi công thức thí nghiệm trồng 20 cây, các cây có chiều cao 2 - 4 cm, 4 - 5 lá, 4 - 5 rễ.

Xử lý số liệu: Các thí nghiệm ở giai đoạn *in vitro* được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Mỗi nghiệm thức được cấy 5 bình. Số liệu thu thập được xử lý trong Microsoft excel và phân tích thống kê bằng phần mềm SPSS.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả khử trùng tạo mẫu sạch bệnh và tái sinh protocorm

Khử trùng mẫu tiến hành theo các bước trình bày ở mục 2.2.1. Qua theo dõi nhận thấy, sử dụng HgCl₂ 0,1% khử trùng quả lan cho hiệu quả cao, tỉ lệ mẫu nhiễm ít, 100% mẫu không

nhằm đều phát sinh thể chồi (protocorm) sau 5 tuần nuôi cấy. Kết quả khử trùng ở thời gian 10 phút cho tỉ lệ hạt không nhiễm và nảy mầm tạo protocorm đạt 82,3%; tỉ lệ hạt không nhiễm và nảy mầm đạt 91,3% với thời gian khử trùng quả 15 phút.

Sau khi gieo hạt lan khoảng 5 tuần, protocorm bắt đầu xuất hiện ở tất cả các công thức thí nghiệm (bảng 1 và hình 1). Tỉ lệ tạo protocorm cao nhất ở môi trường bổ sung BAP 2 mg/l khi khử trùng quả trong 15 phút (đạt 100% sau 25 ngày) và kém nhất trên môi trường bổ sung BAP 1,5 mg/l khi khử trùng trong 10 phút (66,7% sau 40 ngày) (bảng 1).

Bảng 1. Kết quả hình thành protocorm từ hạt của Lan Hoàng thảo phi điệp

Thời gian KT (phút)	NAA (mg/l)	BAP (mg/l)	Protocorm phát sinh từ hạt		
			Tỉ lệ (%)	Thời gian (ngày)	Chất lượng
10	0,2	1,0	80,0	45	TB
		1,5	66,7	40	Đạt
		2,0	83,3	25	Tốt
15		1,0	83,3	45	TB
		1,5	83,3	35	Tốt
		2,0	100,0	25	Tốt



Hình 1. Protocorm phát sinh từ hạt Lan Hoàng thảo phi điệp tím trên môi trường MS chứa BAP 2,0 mg/l. A. Sau 35 ngày; B. Sau 50 ngày; C. Sau 70 ngày

3.2. Kết quả tái sinh chồi và tạo cây hoàn chỉnh

Ảnh hưởng của BAP đến sự tái sinh chồi từ protocorm

Từ protocorm được hình thành sau khi gieo hạt khoảng 60 ngày, tiến hành tách thành các khối protocorm nhỏ và cấy lên môi trường MS có chứa saccharose 10 g/l; than hoạt tính 1 g/l; nước dừa 15%; BAP với hàm lượng thay đổi (mục 2.2.2). Sau 40 ngày theo dõi nhận thấy, hầu hết các công thức thí nghiệm đều có tỉ lệ phát sinh chồi cao (trên 40%). Công thức môi trường CT4 cho khả năng phát sinh chồi từ protocorm cao nhất so với các công thức môi trường thí nghiệm khác với tỉ lệ phát sinh chồi đạt 97,87% (bảng 2) và chồi có chất lượng tốt nhất (kích thước chồi trung bình cao từ 0,5 – 1 cm, chồi xanh đều, mỗi chồi mang từ 3 - 4 lá).

Bảng 2. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng phát sinh chồi từ cụm protocorm

CT	Nồng độ NAA (mg/l)	Nồng độ BAP (mg/l)	Số cụm protocorm đưa vào	Số cụm protocorm phát sinh chồi	Tỷ lệ phát sinh chồi (%)
CT1	0,2	0	40	17	42,5
CT2		1	87	44	50,57
CT3		1,5	132	104	78,79
CT4		2	94	92	97,87

Ảnh hưởng của BAP, kinetin và chất bổ sung đến sự phát triển chồi Lan Hoàng thảo phi điệp in vitro

Tách các cụm chồi nhỏ phát sinh từ protocorm cấy chuyển vào môi trường MS bổ sung BAP, kinetin với nồng độ thay đổi (mục 2.2.2). Kết quả thu được (bảng 3 và hình 2) cho thấy, có sự chênh lệch lớn về hệ số nhân chồi cũng như khả năng phát triển của chồi khi thay đổi nồng độ các chất kích thích sinh trưởng. Trên môi trường không đối chứng, hệ số nhân chồi chỉ đạt 6,72

với chiều cao trung bình là 6,3 mm, số lá trung bình là 1 và chồi yếu với các biểu hiện hình thái như chồi nhỏ, gầy, lá xanh nhạt. Khi bổ sung BAP, kinetin vào môi trường, các chỉ tiêu theo dõi tăng theo tương ứng. Hệ số nhân chồi cao nhất ở CT4 (bổ sung BAP 2 mg/l) với cả hai kích thích sinh trưởng là BAP (hệ số nhân chồi 9,75) và kinetin (hệ số nhân chồi 7,56). Tuy nhiên, hình thái chất lượng chồi tốt nhất lại ở môi trường bổ sung BAP, kinetin 1,5 mg/l.

Bảng 3. Ảnh hưởng của BAP, kinetin lên sự phát triển chồi

CT	Nồng độ (mg/l)	Hệ số tái sinh chồi	Chiều cao chồi (mm)	Số lá/chồi	Hình thái chồi	
BAP	ĐC	0	6,72 ± 0,29	6,3 ± 0,10	1 ± 0,03	Chồi nhỏ, lá xanh nhạt
	CT2	1,0	7,25 ± 0,06	8,3 ± 0,20	1,1 ± 0,23	Chồi nhỏ, lá xanh
	CT3	1,5	8,12 ± 0,16	11,1 ± 0,16	1,67 ± 0,17	Chồi nhỏ, lá xanh đậm
	CT4	2,0	9,75 ± 0,32	11,5 ± 0,24	2,1 ± 0,23	Chồi mập, lá xanh đậm
Kinetin	CT2	1,0	6,34 ± 0,16	6,4 ± 0,10	1,2 ± 0,01	Chồi nhỏ, lá xanh nhạt
	CT3	1,5	8,34 ± 0,14	9,2 ± 0,10	1,9 ± 0,13	Chồi mập, lá xanh
	CT4	2,0	7,56 ± 0,26	8,6 ± 0,02	1,6 ± 0,14	Chồi nhỏ, lá xanh nhạt

Trong nghiên cứu vi nhân giống loài thuộc chi *Dendrobium*, các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (PGR) được sử dụng phổ biến nhất là BAP và NAA, có thể sử dụng dưới dạng kết hợp (56,9%), hoặc đơn lẻ là BAP (29,3%) hay NAA (13,8%) trong môi trường nuôi cấy [7]. BAP là chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin có vai trò quan trọng trong phân chia tế bào và kích thích sự hình thành chồi. Bởi vậy, BAP thường được sử dụng trong giai đoạn nhân chồi. Li và cộng sự (2013) đã kết luận rằng, môi trường thích hợp nhất để tạo chồi và cảm ứng ra rễ giữa các loài khác nhau là khác nhau. Môi trường thích hợp để tạo chồi trong nuôi cấy *D. pendulum* và *D. primulinum* là MS bổ sung BA 0,5 mg/l; NAA 0,1 mg/l; nước dừa 100 ml/l và MS bổ sung BA 0,25 mg/l; NAA 0,1 mg/l; nước dừa 100 ml/l cho nuôi cấy *D. heterocarpum* [13].

Ngoài các hormone sinh trưởng, để thúc đẩy quá trình nuôi cấy giúp cây sinh trưởng nhanh hơn và có chất lượng tốt hơn, các nghiên cứu thường bổ sung thêm dịch chiết một số loại củ quả như cà rốt, khoai tây, chuối [11]. Dịch chiết củ quả chứa những thành phần không xác định có tác dụng kích thích sự sinh trưởng của mô tế bào. Trong thí nghiệm này, khoai tây và chuối xanh nghiền được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để theo dõi sự ảnh hưởng của chúng đến sinh trưởng Lan Hoàng thảo phi điệp *in vitro*. Mỗi bình thí nghiệm được cấy 5 cụm chồi (3 chồi/cụm) trên môi trường MS bổ sung 30 g/l đường saccharose; than hoạt tính 1 g/l; BAP 1 g/l và chuối xanh, khoai tây nghiền (2.2.2), kết quả theo dõi sau 60 ngày được trình bày ở bảng 4. Kết quả cho thấy, ở môi trường đối chứng không bổ sung khoai tây và chuối xanh thì sự nhân chồi thấp nhất với các chỉ số theo dõi đều thấp (hệ số nhân chồi 7,25 chồi/cụm, chiều cao trung bình đạt 8,3 mm và số lá/chồi là 1,1, chồi nhỏ và lá xanh nhạt). Với môi trường bổ sung hàm lượng khoai tây 30 g/l, thì hệ số nhân chồi đạt 10,1 chồi/cụm, chiều cao trung bình đạt 14,8 mm và số lá/chồi là 4,5; khi tăng hàm lượng khoai tây lên 50 g/l thì sự sinh trưởng và phát triển của chồi tăng lên rõ rệt (hệ số nhân chồi đạt 17,6 chồi/cụm, chiều cao trung bình đạt 15,1 mm và số lá/chồi là 2,1). Tương tự với môi trường bổ sung chuối xanh, khi bổ sung 30g/l thì hệ số nhân chồi đạt 12,6 chồi/cụm, chiều cao trung bình đạt 15,1 mm và số lá/chồi là 2,4 còn khi tăng hàm lượng chuối xanh lên 50 g/l (CT5) thì hệ số nhân chồi đạt 15,8 chồi/cụm, chiều cao trung bình đạt 18,5 mm và số lá/chồi là 2,8.

Bảng 4. Ảnh hưởng của khoai tây và chuối xanh đến sự phát triển chồi Lan Phi điệp *in vitro*

Môi trường	Hàm lượng (mg/l)	Số chồi/cụm	Chiều cao chồi (mm)	Số lá/chồi	Hình thái chồi
ĐC	0	7,25 ± 0,06	8,3 ± 0,20	1,1 ± 0,23	Chồi nhỏ, lá xanh nhạt
Chuối xanh	30	12,6 ± 0,06	15,1 ± 0,16	2,37 ± 0,17	Chồi mập, lá xanh
	50	15,8 ± 0,12	18,5 ± 0,24	2,8 ± 0,02	Chồi mập, lá xanh
Khoai tây	30	10,1 ± 0,01	14,8 ± 0,32	2,1 ± 0,01	Chồi nhỏ, lá xanh
	50	17,6 ± 0,04	21,2 ± 0,04	2,4 ± 0,34	Chồi mập, lá xanh

Kết quả thu được cho thấy, đối với môi trường bổ sung dịch chiết sự hình thành và phát triển chồi cây tốt hơn môi trường không bổ sung do các dịch chiết tự nhiên thường chứa niacin và một số vitamin, có tác dụng kích thích sự nảy mầm và sinh trưởng của cây lan [14]. Jaime và đồng tác giả (2015) khi tổng hợp các nghiên cứu vi nhân giống *Dendrobium* cho thấy, các chất phụ gia thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy *Dendrobium* là nước dừa, than hoạt tính, chiết xuất chuối, peptone và một số những chất khác [7]. Trong nghiên cứu này, khi bổ sung 50 g/l khoai tây nghiền vào môi trường cho thấy số chồi/cụm nhiều nhất (17,6 chồi/cụm), chiều cao chồi đạt 21,2 mm/chồi và chồi có màu xanh khỏe. Như vậy, có thể nhận xét rằng, môi trường thích hợp cho nhân chồi Lan Hoàng thảo phi điệp là MS bổ sung đường saccharose 25 g/l; agar 6 g/l; than hoạt tính 1 g/l; BAP 1 g/l và khoai tây 50 g/l.



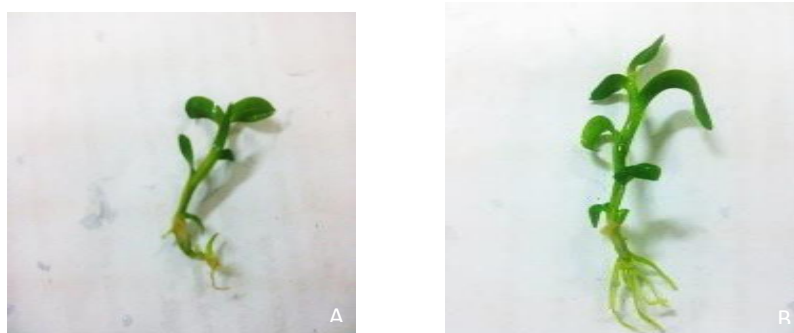
Hình 2. Một số hình ảnh tái sinh và phát triển chồi từ protocorm Lan *D. asomum* in vitro
A. Chồi tái sinh từ protocorm trên môi trường 2 mg/l BAP; B. Chồi sinh trưởng và phát triển trên môi trường có kinetin 2 mg/l; C. Chồi trên môi trường bổ sung 50 mg/l chuối xanh

Ảnh hưởng của α - NAA đến khả năng ra rễ Lan Hoàng thảo phi điệp tím in vitro

α - NAA là hormone sinh trưởng thuộc nhóm auxin, vai trò của α - NAA là thúc đẩy sự sinh trưởng và dẫn nẩy của tế bào thực vật, tăng cường quá trình tổng hợp và trao đổi các chất như ADN, protein... Ngoài ra, nó còn kích thích sự ra rễ, kéo dài rễ và tham gia vào cảm ứng tạo chồi vô tính trong ống nghiệm. Trong nghiên cứu này, các chồi đạt kích thước 3 - 5 cm được cấy lên môi trường MS bổ sung đường saccharose 30 g/l; agar 6 g/l; than hoạt tính 1 g/l; khoai tây 50 g/l và NAA với dải nồng độ thay đổi từ 0 đến 0,75 mg/l. Kết quả theo dõi sau 80 ngày được trình bày trong bảng 5. Kết quả bảng 5 cho thấy, môi trường bổ sung α - NAA ở các hàm lượng khác nhau thì ảnh hưởng khác nhau tới sự ra rễ Lan Hoàng thảo Phi điệp in vitro. Ở môi trường đối chứng, tỷ lệ ra rễ thấp chỉ đạt 20%, số rễ trung bình 0,8 rễ/cây; độ dài rễ là 2 mm; rễ nhỏ, ngắn, màu xanh nhạt. Khi bổ sung α - NAA môi trường nuôi cấy, tỉ lệ chồi ra rễ cao. Ở nồng độ NAA 0,2 mg/l, tỉ lệ ra rễ đạt 72%, số rễ/cây là 1,5; độ dài rễ là 3,9 mm; rễ nhỏ, màu xanh. Khi tăng nồng độ NAA lên 0,5 mg/l thì tỉ lệ ra rễ tăng lên 80%, độ dài rễ lên đến 3,0 mm và số rễ trung bình trên một cây đạt 5,1, rễ mập, dài, màu trắng đục, chóp rễ màu xanh (hình 3). Khi tiếp tục tăng nồng độ NAA lên 0,7 mg/l thì số rễ trên cây, chiều dài rễ giảm tương ứng là 1,88 và 4,2 mm. Rễ dài, nhỏ, màu trắng và chóp rễ xanh (bảng 5). Kết quả thí nghiệm cho thấy, nồng độ α - NAA 0,5 mg/l là thích hợp cho sự ra rễ của Lan Hoàng thảo phi điệp in vitro.

Bảng 5. Ảnh hưởng của α - NAA đến khả năng tạo rễ của Lan Hoàng thảo phi điệp in vitro

CT	Nồng độ α - NAA	Tỉ lệ cây ra rễ (%)	Số rễ tb/cây	Độ dài tb rễ (mm)	Đặc điểm rễ
ĐC	0	20	$0,8 \pm 0,01$	$2,0 \pm 0,12$	Rễ nhỏ, ngắn, màu trắng
CT1	0,2	72	$1,5 \pm 0,05$	$3,9 \pm 0,13$	Rễ nhỏ, màu trắng đục
CT2	0,5	80	$3,0 \pm 0,11$	$5,1 \pm 0,02$	Rễ mập, dài, màu trắng đục
CT3	0,7	76	$1,88 \pm 0,03$	$4,2 \pm 0,08$	Rễ dài, nhỏ, trắng, chóp rễ có màu xanh



Hình 3. Ảnh hưởng của α - NAA đến khả năng tạo rễ của lan sau 30 ngày.
A. ĐC; B. chồi lan ra rễ trên môi trường bổ sung NAA 0,5mg/l

3.3. Ảnh hưởng chế phẩm dinh dưỡng đến sinh trưởng và phát triển của lan *P. asomum* trong vườn ươm

Khi cây con *in vitro* đã đạt đủ tiêu chuẩn về kích thước, hình thái và ra rễ, chúng tôi tiến hành đưa cây ra vườn ươm. Giá thể ươm cây sử dụng rêu rừng đã qua xử lý thuốc diệt nấm đảm bảo sạch, hạn chế tối đa sự nhiễm bệnh cho lan con. Tiến hành chăm sóc các cây con bằng các chế phẩm dinh dưỡng khác nhau nhằm khảo sát ảnh hưởng của các chế phẩm dinh dưỡng tới sự sinh trưởng của cây lan con. Thí nghiệm tiến hành trên 3 công thức (CT1: Đối chứng; CT2: chăm sóc bằng dung dịch $\frac{1}{2}$ MS; CT3 sử dụng phân đầu trâu 501 theo HDSD) mỗi công thức trồng 20 cây con đồng đều (chiều cao trung bình khoảng 2 – 4 cm, 4 - 5 rễ/chồi, chồi mang 4 – 5 lá). Tần suất chăm sóc 3 ngày/lần, giữ ẩm hàng ngày.

Bảng 6. Ảnh hưởng của một số loại phân bón đến sự phát triển lan *P. asomum* giai đoạn vườn ươm

Loại phân bón	Tỉ lệ cây sống (%)	Chiều cao cây	Số lá/ cây	Đặc điểm cây
Nước lã (ĐC)	85	4,54 $\pm$ 0,15	4,56 $\pm$ 0,12	Lá xanh nhạt, không ra rễ mới, rễ cũ có màu xanh nhạt
Phân đầu trâu 501	95	4,86 $\pm$ 0,15	4,6 $\pm$ 0,03	Lá xanh, ra rễ mới, rễ xanh, cây nảy chồi con
$\frac{1}{2}$ MS	95	5,20 $\pm$ 0,01	4,8 $\pm$ 0,04	Lá xanh, ra rễ mới, rễ xanh, cây nảy chồi con

Kết quả theo dõi được trình bày trên bảng 6 cho thấy chế phẩm dinh dưỡng sử dụng có tác dụng tăng chiều cao cây và kích thích sự ra lá mới cho lan con. Các cây được chăm sóc bằng chế phẩm dinh dưỡng đều có biểu hiện sinh trưởng tốt trong đó sử dụng $\frac{1}{2}$ MS chăm sóc lan con giai đoạn mới ra cây cho kết quả tốt hơn phân bón đầu trâu 501 với các chỉ tiêu tăng trưởng gồm chiều cao cây trung bình 5,2 cm, số lá trung bình là 4,8; lá xanh, ra rễ mới, rễ xanh (bảng 6).

4. Kết luận

Trong nghiên cứu nhân giống *in vitro* Lan Hoàng thảo Phi điệp tím: (1) môi trường MS bổ sung 10 g/l sucrose; 1 g/l than hoạt tính; 0,2 mg/l NAA và 2 mg/l BAP thích hợp cho sự phát sinh protocorm từ hạt; (2) Môi trường MS bổ sung đường 25 g/l sucrose; 6 g/l agar; 1 g/l than hoạt tính; 1 g/l BAP và 50 g/l khoai tây thích hợp cho sinh trưởng và phát triển chồi *D.asomum* Lind. *in vitro*; (3) Môi trường bổ sung NAA nồng độ 0,5 mg/l kích thích sự hình thành và phát triển rễ tốt nhất; (4) Giá thể rêu rừng phù hợp để ra cây con *in vitro*, chăm sóc cây giai đoạn đầu bằng dung dịch $\frac{1}{2}$ MS cho kết quả tốt (tỷ lệ cây sống đạt 95%; cây to khỏe ra rễ nhiều, chồi non sinh trưởng tốt).

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] D. H. Duong, *Vietnamese flora*. Science and Technology Publishing House, 2007.

-
- [2] A. Kowitdamrong, P. Chanvorachote, B. Sritularak, and V. Pongrakhananon, "Moscatilin inhibits lung cancer cell motility and invasion via suppression of endogenous reactive oxygen species," *Biomed. Res. Int.*, vol. 2013, 11 pages, 2013, Article ID 765894.
- [3] C. Chu, H. Yin, X. Li, D. Cheng, J. Yan, and Z. Lin, "Discrimination of *Dendrobium officinale* and Its Common Adulterants by Combination of Normal Light and Fluorescence Microscopy," *Molecules*, vol. 19, pp. 3718-3730, 2014.
- [4] T. L. Do, *Medicinal plants and medicines in Viet Nam*. Medical Publishing House, Viet Nam, 2004.
- [5] Ministry of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, *Viet Nam red book. Part II. Plant*. Natural Science and Technology Publishing House, 2007.
- [6] H. Tran, *Viet Nam orchid*. Ha Noi Agriculture Publishing House, 1988.
- [7] A. Jaime, S. D. Teixeira, C. C. Jean, J. Dobránszki, and Z. Songjun, "Dendrobium micropropagation: a review," *Plant Cell Rep*, vol. 34, pp. 671-704, 2015.
- [8] S. Rao and B. Barman, "In vitro micropropagation of *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl. A threatened orchid," *SAJB*, vol. 2, pp. 39-42, 2014.
- [9] T. S. Nguyen, B. T. Tu, T. N. Dang, T. L. A. Nguyen, T. N. Hoang, and Q. T. Nguyen, "In vitro propagation of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo," *Journal of Science and Development*, vol. 12, pp. 1274-1282, 2014.
- [10] V. V. Nguyen, "Using in vitro culture technique for the propagation of *Dendrobium litiiflorum* Lindley," *Journal of Forestry Science and Technology*, vol. 4, pp. 39-45, 2017.
- [11] T. T. Dang, N. B. H'Yon, T. T. H. Nguyen, V. K. Dinh, V. D. Nong, T. V. Tran, V. H. Quach, and K. C. Vu, "Micropropagation of *Dendrobium heterocarpum* Lindl.," *Journal of Biotechnology*, vol. 16, pp. 127-135, 2018.
- [12] T. Murashige and F. Skoog, "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures," *Physiologia Plantarum*, vol. 15, pp. 473-497, 1962.
- [13] Y. Li, D. H. Zhu, H. T. Pan, and Q. X. Zhang, "In vitro propagation of three *Dendrobium* species from stems," *J Northeast Forest Univ*, vol. 41, pp. 77-81, 2013.
- [14] M. O. Islam, S. Matsui, and S. Ichihashi, "Effect of complex organic additives on seed germination and carotenoid content in *Cattleya* seedlings," *Lindleyana*, vol. 15, pp. 81-88, 2000.