ESEARCH ON PROCEDURE THE MICROPROPAGATION FOR ORCHID SPECIES *Brassavola nodosa*

Pham Thi Thu Nhi, Pham Quynh Anh*
Research & Development Center for High Technology Agriculture

ARTICLE INFO

Received: 28/3/2022
Revised: 27/4/2022
Published: 28/4/2022

KEYWORDS

Brassavola nodosa
Apex-shoot
Knudson C (1946)
Rhynchostylys gigantean
RITA®

ABSTRACT

Brassavola nodosa belongs to the Orchidaceae with flowers that are various in color, shape, and especially fragrance. *Brassavola nodosa* are being interested in developing planting areas, creating valuable genetic resources for hybridization, and selecting and creating new orchid varieties. In this study, 7-10 cm young shoots of *Brassavola nodosa* were surface sterilized and then taken 2 cm disinfected apex for rapid regeneration and multiplication. The results showed that MS media supplemented BA 1.5 mg.L^{-1} and NAA 0.25 mg.L^{-1} was suitable for *in vitro* shoot regeneration, the rate of shoot regeneration reached 97.78%, the number of generated shoots per explants was 16.89. The frequency of submergence and the duration of submergence for rapid shoot multiplication in the RITA® temporary submerged culture system were 6 times/day and 1 minute, repectively. The multiplication coefficient of shoot reached 14.48 times. Knudson C Mineral Medium (1946) was suitable for rooting of *in vitro* shoots. The survival rate of plants in the nursery period after 4 weeks of planting was 100%.

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG *IN VITRO* LOÀI LAN *Brassavola nodosa*

Phạm Thị Thu Nhi, Phạm Quỳnh Anh*
Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ Cao

THÔNG TIN BÀI BÁO

Ngày nhận bài: 28/3/2022
Ngày hoàn thiện: 27/4/2022
Ngày đăng: 28/4/2022

TỪ KHÓA

Brassavola nodosa
Chồi đỉnh
Knudson C (1946)
Rhynchostylys gigantean
RITA®

TÓM TẮT

Brassavola nodosa thuộc họ Phong lan (Orchidaceae) có hoa rất đa dạng về màu sắc, hình dáng, đặc biệt về hương thơm. Trong nghiên cứu này, chồi non lan *Brassavola nodosa* có chiều cao từ 7 – 10 cm được khử trùng bề mặt. Sau đó, chồi có kích thước 2 cm không bị nhiễm sẽ tách ra tái sinh và nhân nhanh. Kết quả cho thấy, môi trường MS bổ sung BA 1,5 mg/L và NAA 0,25 mg.L^{-1} cho tỉ lệ mẫu tạo chồi là 97,78 %, số chồi phát sinh là 16,89 chồi/mẫu. Tần suất ngập chìm và thời gian ngập chìm thích hợp cho sự nhân nhanh chồi trong hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời RITA® là 6 lần/ngày và thời gian ngập là 1 phút cho chỉ số tăng trưởng chồi đạt 14,48 lần. Môi trường khoáng Knudson C (1946) phù hợp cho sự ra rễ của chồi *in vitro*. Tỉ lệ sống sót của cây ở giai đoạn vườn ươm sau 4 tuần trồng đạt 100%.

DOI: https://doi.org/10.34238/tnu-jst.5758

* Corresponding author. *Email:phamthithunhi1997@gmail.com*

1. Giới thiệu

Hoa lan được người tiêu dùng ưa chuộng bởi sự đa dạng về màu sắc, hình dáng và hương thơm của chúng. Những năm gần đây, dòng lan *Brasssavola* đang dần trở nên phổ biến với nhu cầu thị trường ngày càng cao. Đây là loài cây có thân ngắn, lá mọc đơn từng chiếc một, và hoa mọc thành từng chùm ở ngọn lá mới mọc, thường là 5-7 bông hoa với cánh và đài hoa nhỏ màu xanh nhạt, lưỡi trắng tuyền, hình trái tim [1]. *Brassavola nodosa*, một loài lan rừng có hoa thơm, được người tiêu dùng đánh giá là loài lan đứng đầu với 22 điểm, so với *Rhynchostylis gigantea* với 14 điểm. Vì vậy, cây lan *Brassavola nodosa* đang được quan tâm để phát triển diện tích trồng, đặc biệt chúng là nguồn gen có giá trị phục vụ công tác lai, chọn tạo giống hoa lan mới.

Hầu hết các nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài cây này ở Việt Nam và trên thế giới chưa nhiều, cây con hậu nuôi cấy mô thuộc chi *Brassavola* thường có kích thước nhỏ [2]-[8]. Năm 2017 Mengarda và cộng sự đã nghiên cứu sự nhân nhanh, sự tạo rễ *in vitro* và sự huấn luyện cây *Brassavola tuberculata* Hook, một loài thuộc chi *Brassavola* [2]. Mỗi loài cây có nhu cầu sinh trưởng và phát triển khác nhau, dù thuộc cùng chi thực vật. Mặt khác, trong thời gian vừa qua, nhiều nghiên cứu xây dựng và hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* các giống lan có giá trị thương mại cao được thực hiện trong nước [2]-[8]. Tuy nhiên, chưa có quy trình nhân giống *in vitro* của chi *Brassavola*. Ngày nay, nhu cầu bảo tồn, lưu trữ và nhân giống *in vitro* các giống lan rừng quý ngày càng cao với nguồn mẫu là các chồi bên hay đoạn thân của chúng. Việc nhân nhanh với số lượng lớn cây giống trong khi nguồn mẫu ban đầu hạn chế, nhiều khi chỉ là một mẫu chồi hay đoạn thân duy nhất đòi hỏi cần phải xác định được các điều kiện nuôi cấy tối ưu như môi trường nuôi cấy, kỹ thuật xử lý mẫu cấy và phương thức nuôi cấy thích hợp nhằm đáp ứng nhu cầu tiêu thụ là điều cần thiết [9]. Nghiên cứu này tiến hành nhân giống *in vitro* cây lan *Brassavola nodosa*, vật liệu sử dụng để nhân giống là các chồi non lan *Brassavola nodosa* trên hệ thống ngập chìm tạm thời. Một số bước của quy trình cũng được nghiên cứu hoàn thiện.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Hình 1. *Vật liệu khởi đầu, chồi in vitro lan Brassavola nodosa*

2.1. Vật liệu, thiết bị

Thực vật: Cây giống *Brassavola nodosa* có chồi non 1 – 2 tháng tuổi, có chiều cao 7 -10 cm, được mua tại vườn hoa lan của Nguyễn Thị Tường Vi (Ấp Xà Mách, xã Lai Uyên, huyện Bàu Bàng, tỉnh Bình Dương).

Hóa chất, chất điều hòa sinh trưởng: các muối đa lượng, vi lượng thuộc hãng Merck (Đức); chất điều hòa sinh trưởng thực vật (ĐHSTTV) BA (Benzylaminopurine), NAA (Naphthaleneaceticd), Kinetin thuộc hãng Merck (Đức); Môi trường pha sẵn Knudson C (KC), Vacin & went thuộc hãng Duchefa (Hà Lan); đường Biên Hòa (Việt Nam); agar Nam Hạ long (Việt Nam); nước dừa, chuối thu mua từ chợ Phạm Văn Cội, Hyponex 20-20-20 (Trung Quốc), javel Mỹ Hảo (Việt Nam).

Môi trường nuôi cấy: MS (Murashige và Skoog, 1962) gồm các khoáng đa lượng, vi lượng, vitamin, đường 30g. L^{-1}, chất điều hòa sinh trưởng thực vật, môi trường được điều chỉnh pH 5,8±0,1 trước khi bổ sung agar 8g. L^{-1}

Thiết bị nuôi cấy ngập chìm tạm thời RITA® thuộc hãng Cirad (Pháp) gồm máy bơm, bình chứa mẫu dung tích 1L có 2 ngăn, ống dẫn khí, van, màng lọc.

Điều kiện nuôi cấy: Phòng nuôi cấy có nhiệt độ 25±2°C, cường độ ánh sáng 2000 lux, ẩm độ là 60 ± 5%, thời gian chiếu sáng là 10 giờ/ngày. Điều kiện vườn ươm có lưới che nắng, mưa, có 20-25% ánh sáng, 60-65% độ ẩm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tạo vật liệu khởi đầu

Sử dụng các chồi non cây lan *Brassavola nodosa* 1 – 2 tháng tuổi, chiều cao 7 -10 cm để làm vật liệu nghiên cứu ban đầu. Đầu tiên sẽ loại bỏ lá và bẹ lá, rồi lắc với xà phòng trong 10 phút và rửa sạch. Chuyển vào tủ cấy, rửa sạch với nước cất vô trùng, sau đó lắc mẫu với cồn 70° trong 1 phút. Sử dụng nước cất vô trùng để rửa sạch mẫu, sau đó khử trùng mẫu bằng javel Mỹ Hảo (với tỷ lệ javel: nước vô trùng là 2:1) trong 30 phút, rửa lại bằng nước cất vô trùng, cắt phần mẫu bị tổn thương, cấy mẫu vào môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962). Sau 2 tuần nuôi cấy, các mẫu sống, vô trùng được cấy chuyền sang môi trường khoáng MS bổ sung BA 1 $mg.L^{-1}$, nước dừa 100 ml/L, 30 $g.L^{-1}$đường sucrose, 8 g/L agar. Sau 8 tuần nuôi cấy, chồi *in vitro* sạch đạt kích thước khoảng 2 – 2,5 cm, chồi xanh, khỏe được sử dụng để bố trí thí nghiệm (Hình 1).

2.2.2. Tái sinh chồi in vitro

Tách các lớp lá và bẹ lá của chồi ngủ *in vitro* để lộ phần chồi đỉnh có chiều dài khoảng 2 mm, cấy vào môi trường MS có bổ sung BA (nồng độ 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 $mg.L^{-1}$) và NAA (nồng độ 0; 0,1; 0,25; 0,5 $mg.L^{-1}$), 30 $g.L^{-1}$đường sucrose, 8 $g.L^{-1}$ agar. Sau 8 tuần nuôi cấy, ghi nhận tỷ lệ mẫu tạo chồi (%), số chồi phát sinh (chồi/mẫu), hình thái chồi.

2.2.3 Nhân nhanh chồi in vitro trong hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời RITA®

Các cụm chồi có kích thước khoảng 0,5 cm, trọng lượng khoảng 1 gam được đưa vào nuôi cấy trong môi trường có bổ sung 1 $mg.L^{-1}$ Kinetin, 100 $ml.L^{-1}$ nước dừa, 30 $g.L^{-1}$ đường bằng hệ thống ngập chìm tạm thời được điều chỉnh ở các mốc thời gian 1, 2 và 3 giờ với tần suất ngập chìm là 2, 4 và 6 lần trong 24 giờ. Sau 8 tuần nuôi cấy, ghi nhận kết quả về hình thái chồi, chỉ số tăng trưởng chồi.

2.2.4. Ra rễ tạo cây in vitro hoàn chỉnh

Chồi *in vitro* có cùng nguồn gốc với kích thước khoảng 2 cm, chưa có rễ được cấy sang các môi trường khảo sát (MS, 1/2MS, Knudson C (KC), Vacin & went và Hyponex@) có bổ sung 100 $ml.L^{-1}$ nước dừa, 30 $g.L^{-1}$ đường sucrose, 8 $g.L^{-1}$ agar. Sau 8 tuần nuôi cấy, ghi nhận kết quả về số lá (lá/cây), số rễ phát sinh (rễ/cây), chiều cao cây (cm).

2.2.5. Huấn luyện cây in vitro thích nghi với điều kiện tự nhiên

Cây *Brassavola nodosa in vitro* đủ tiêu chuẩn ra vườn ươm là cây có chiều cao từ 4 – 5 cm, 4 – 5 rễ, 4 – 5 lá. Điều kiện trồng trong vườm ươm có lưới che nắng cung cấp 20 - 25% ánh sáng và 60 - 65% độ ẩm. Tuần đầu tưới ngày 2 lần vào 8h30 và 15h, mỗi lần tưới khoảng 2 phút, 0,5 $lít/m^2$. Tuần kế tiếp duy trì tưới và kết hợp phun B1 2 lần/tuần. Ở tuần tiếp theo sẽ sử dụng phân bón NPK 30 - 10 – 10, tiến hành phun 2 lần/tuần. Giá thể trồng là sơ dừa đã xử lý chất chát, được đập mềm đến tơi. Theo dõi tỷ lệ sống của cây sau 4 tuần nuôi.

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thu thập được xử lý thống kê bằng chương trình Statgraphic 3.0. Đọc kết quả dựa vào bảng ANOVA, bảng trung bình và bảng so sánh khác biệt giữa các nghiệm thức (được kiểm tra bằng phương pháp Duncan và LSD tại α=0,05).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả tái sinh chồi in vitro

Trong thí nghiệm này, BA được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp với NAA để tái sinh chồi *in vitro*. Kết quả thể hiện ở Bảng 1, Hình 2 cho thấy tỉ lệ mẫu tạo chồi từ chồi đỉnh lan *Brassavola nodosa* phụ thuộc vào loại và nồng độ chất kích thích sinh trưởng có mặt trong môi trường tạo chồi. Môi trường tạo chồi không có bổ sung chất ĐHSTTV (ĐC) và môi trường có bổ sung nồng độ BA thấp từ 0 – 0,5 mg.L^{-1} kết hợp với NAA (0,0; 0,1; 0,25; 0,5 mg.L^{-1}) đều không kích thích tạo chồi từ đỉnh chồi lan *Brassavola nodosa in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy (Hình 2). Ngược lại, trên môi trường có bổ sung nồng độ BA cao hơn từ 1 – 2 mg.L^{-1} kết hợp với nồng độ NAA từ 0 – 0,5 mg.L^{-1} thì sự tạo chồi diễn ra khá sớm ngay sau tuần đầu tiên. Đến tuần thứ 2, tỉ lệ tạo chồi tăng lên và tỉ lệ này đạt 97,78% kể từ tuần thứ 4 trở đi. Cụ thể, tỉ lệ tạo chồi lan đạt giá trị cao nhất khi nuôi cấy chồi đỉnh trên môi trường có bổ sung BA 1,5 mg.L^{-1} và NAA 0,25 mg.L^{-1}, khác biệt rất có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại (P<0,01) (Hình 2).

Số lượng chồi được hình thành từ chồi đỉnh lan *Brassavola nodosa in vitro* đã gia tăng theo thời gian nuôi cấy trong điều kiện *in vitro*, nhờ sự tác động của các chất ĐHSTTV thuộc nhóm cytokinin phối hợp với nhóm auxin, đặc biệt là ở môi trường có bổ sung nồng độ BA 1,5 mg.L^{-1} và NAA 0,25 mg.L^{-1} đã kích thích sự hình thành chồi đạt giá trị trung bình cao nhất sau 8 tuần nuôi cấy, với 16,89 chồi/mẫu, khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê (P<0,01). Nồng độ BA 1,5 mg.L^{-1} tỷ lệ mẫu tái sinh chồi cao với 97,78% và số chồi tái sinh trên mỗi mẫu là 16,89, chồi xanh tươi tốt. Những nghiệm thức chỉ bổ sung riêng lẻ BA tỷ lệ mẫu tái sinh chồi và số chồi tái sinh thấp, đa số mẫu hóa nâu và chết sau một thời gian nuôi cấy. Nghiệm thức bổ sung BA kết hợp với NAA nồng độ 0,1 mg.L^{-1} cũng cho kết quả tương tự. Nghiệm thức bổ sung BA kết hợp với NAA 0,5 mg.L^{-1}, tỷ lệ mẫu tái sinh chồi giảm dần, mẫu có hiện tượng hóa nâu, một số mẫu tăng kích thước và tạo thành cụm dạng PLBs ở nghiệm thức bổ sung BA 2 mg.L^{-1}. Các nghiệm thức còn lại mẫu hóa nâu và chết dần theo thời gian nuôi cấy.

Bảng 1. *Ảnh hưởng của nồng độ BA kết hợp với NAA lên sự tạo chồi từ chồi đỉnh sau 8 tuần nuôi cấy*

Nồng độ BA (mg.L^{-1})	Nồng độ NAA (mg.L^{-1})	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu	Hình thái chồi
0	0	0^{g}	0^{g}	
0,5		0^{g}	0^{g}	
1,0		$24,44^{f}$	$1,89^{f}$	Chồi nhỏ
1,5		$42,22^{e}$	$1,89^{f}$	Chồi nhỏ
2,0		$48,89^{de}$	$2,44^{de}$	Chồi nhỏ
0	0,1	0^{g}	0^{g}	
0,5		0^{g}	0^{g}	
1,0		$42,22^{e}$	$2,11^{ef}$	Chồi nhỏ
1,5		$55,56^{d}$	$2,33^{ef}$	Chồi nhỏ
2,0		$48,89^{de}$	$2,89^{d}$	Chồi nhỏ, có PLB
0	0,25	0^{g}	0^{g}	
0,5		0^{g}	0^{g}	
1,0		$55,56^{d}$	$2,22^{ef}$	Chồi nhỏ
1,5		$97,78^{a}$	$16,89^{a}$	Chồi nhỏ, đồng đều, có PLB
2,0		$93,33^{a}$	$8,44^{b}$	Chồi nhỏ, nhiều PLB
0	0,5	0^{g}	0^{g}	
0,5		0^{g}	0^{g}	
1,0		$55,56^{d}$	$2,56^{de}$	Chồi nhỏ
1,5		$68,89^{c}$	$4,22^{c}$	Chồi nhỏ, nhiều PLB
2,0		80^{b}	$4,33^{c}$	Chồi nhỏ, nhiều PLB
$F_{tính}$		$189,09^{**}$	$638,66^{**}$	
CV (%)		12,06	10,42	

*Ghi chú: **: Trong cùng 1 cột, kí tự theo sau khác nhau (a, b, c…) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức p ≤ 0,05.*

a) ĐC | *b) BA 1,5 mg/L và NAA 0,1 mg/L* | *c) BA 1,5 mg/L và NAA 0,25 mg/L* | *d) BA 1,5 mg/L và NAA 0,5 mg/L*

Hình 1. *Chồi tái sinh từ chồi đỉnh của lan Brassavola nodosa sau 8 tuần nuôi cấy, thang đo 1 cm*

Vì vậy, môi trường MS bổ sung BA 1,5 mg.L^{-1} và NAA 0,25 mg.L^{-1} là môi trường thích hợp cho sự tạo chồi từ chồi đỉnh của lan *Brassavola nodosa*.

3.2. Nhân nhanh chồi lan Brassavola nodosa in vitro trong hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời RITA®

Môi trường không khí trong hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời - Temporary immersion system (TIS) luôn được trao đổi giữa trong và ngoài bình thông qua hệ thống bơm và các màng lọc. PLBs tái sinh trong hệ thống TIS phát triển rất tốt do sinh trưởng trong môi trường thoáng khí [7],[8]. Đồng thời với sự khuếch tán đều chất dinh dưỡng, các mẫu cấy được đồng bộ hóa, do đó thúc đẩy sự tăng trưởng đồng đều của mẫu nuôi cấy. Các chồi được nhân giống trong hệ thống này sẽ phát triển nhanh hơn, cho năng suất cao hơn, chất lượng tốt và đồng đều hơn.

Bảng 2. *Ảnh hưởng của thời gian ngập chìm và tần suất ngập chìm lên sự nhân nhanh chồi sau 8 tuần nuôi cấy*

Tần suất ngập chìm (lần/ngày 24 giờ)	Thời gian ngập chìm (phút)	Chỉ số tăng trưởng của chồi	Hình thái chồi
4	1	8,07^{e}	Chồi nhỏ
4	2	8,43^{de}	Chồi nhỏ
4	3	9,14^{d}	Chồi nhỏ
6	1	14,48^{b}	Chồi to, màu xanh nhạt, PLB tăng sinh tốt và có lông hút
6	2	16,64^{a}	Chồi to, màu xanh nhạt, PLB tăng sinh nhiều, một số PLB bị mọng nước
6	3	16,72^{a}	Chồi to, màu xanh nhạt, PLB tăng sinh nhiều, một số PLB bị mọng nước
12	1	13,26^{c}	Chồi nhỏ và tăng sinh ít, PLB bị mọng nước
12	2	13,59^{c}	Chồi nhỏ và tăng sinh ít, bị mọng nước
12	3	13,04^{c}	Chồi nhỏ và tăng sinh ít, PLB bị mọng nước
ĐC		6,96^{f}	Chồi to, màu xanh đậm, có PLB tăng sinh
$F_{tính}$		153,47**	
CV (%)		4,17	

*Ghi chú**: Trong cùng 1 cột, kí tự theo sau khác nhau (a, b, c…) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức p ≤ 0,05*

Dựa vào số liệu thu được ở Bảng 2, Hình 3 cho thấy chỉ số tăng trưởng của chồi lan *Brassavola nodosa* phụ thuộc vào tần suất ngập chìm (lần/ngày) và thời gian ngập chìm (phút) của hệ thống ngập chìm tạm thời RITA®. Cụ thể, ở tần suất ngập chìm 6 lần/ngày với các mức thời gian ngập chìm khác nhau (1, 2 và 3 phút) đã cho chỉ số tăng trưởng trung bình của chồi đạt giá trị cao nhất từ 14,48 – 16,72 lần, trong đó ở mức thời gian ngập chìm 1 phút chồi tăng sinh tốt nhất, có PLB tăng

sinh và có xu hướng tái sinh chồi, chồi to, xanh tươi và phát triển tốt. Ở thời gian ngập chìm 2 và 3 phút, chỉ số tăng trưởng khá cao nhưng chồi tăng sinh ít hơn và PLB tăng sinh mạnh, có 1 số PLB có biểu hiện bị thủy tinh thể. Có thể thấy, sự kết hợp giữa điều kiện thoáng khí và chu kỳ tiếp xúc của mô thực vật và môi trường nuôi cấy đã tạo nên hiệu quả của hệ thống ngập chìm RITA® [6]. Hai đặc điểm này thường không đi chung với nhau trong các hệ thống nuôi cấy *in vitro* trên môi trường lỏng khác. Trong các hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời, thời gian ngập chìm mẫu trong môi trường dinh dưỡng là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự hấp thu chất dinh dưỡng của mô thực vật cũng như hạn chế hiện tượng thủy tinh thể. Trong nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây lan Kiếm vàng Phan Trí cũng đã sử dụng hệ thống ngập chìm tạm thời RITA® và kết quả cho thấy ở tần suất ngập tối ưu là 3 phút sau mỗi 4 giờ cũng cho kết quả số chồi gia tăng lên đến 84,06 chồi/mẫu [7].

Tần suất ngập chìm 4 lần/ngày trong 3 phút | *Tần suất ngập chìm 6 lần/ngày trong 1 phút* | *Tần suất ngập chìm 12 lần/ngày trong 1 phút*

Hình 2. *Chồi lan Brassavola nodosa trong hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời RITA®sau 60 ngày nuôi cấy, thang đo 1 cm*

Ở tần suất ngập chìm 4 lần/ngày với các mức thời gian ngập chìm khác nhau cho thấy chỉ số tăng trưởng trung bình của chồi đạt giá trị từ 8 – 9 lần, tất cả các chồi thu được đều nhỏ và xanh tốt, có biểu hiện khô, hơi thiếu nước. Trong khi đó, ở tần suất ngập chìm 12 lần/ngày với các mức thời gian ngập chìm khác nhau cho thấy chỉ số tăng trưởng trung bình của chồi đạt giá trị từ 13,04 – 13,59 lần, tất cả các chồi và PLB thu được đều bị thủy tinh thể và thời gian ngập chìm càng tăng thì hiện tượng thủy tinh thể càng cao (Hình 3). Theo Krueger và cộng sự (1991) nhấn mạnh vai trò của tần suất ngập chìm lên quá trình nhân chồi ở cây hoa anh đào *(Serviceberry*) [8]. Cây bị thủy tinh thể khi xử lý ở chu trình mỗi 30 phút, mẫu sẽ ngập chìm trong 5 phút và mẫu không thủy tinh thể khi xử lý ngập 5 phút trong chu kỳ 60 phút. Do đó, nếu thời gian ngập chìm mẫu ngắn và tần suất ngập chìm dài tạo ra stress nước làm cho mô cấy bị mất nước và nếu kéo dài có thể gây chết mẫu.

Vì vậy trong thí nghiệm này, tần suất ngập chìm và thời gian ngập chìm thích hợp cho sự nhân nhanh chồi lan *Brassavola nodosa in vitro* trong hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời RITA®là 6 lần/ngày và thời gian ngập là 1 phút.

3.3. Ra rễ tạo cây in vitro hoàn chỉnh

Trong sự sinh trưởng và phát triển của cây, các thành phần đa lượng vi lượng, vitamin,… trong môi trường nuôi cấy có vai trò rất lớn. Môi trường không phù hợp cây sẽ chậm phát triển chiều cao cây, rễ và lá của cây kém chất lượng. Điều đó dẫn đến ảnh hưởng tới sức sống của cây con *in vitro* khi mang ra trồng ngoài vườn ươm.

Trong thí nghiệm này, ảnh hưởng của một số loại môi trường khoáng cơ bản đến sự tăng trưởng lan *Brassavola nodosa in vitro* được khảo sát. Kết quả về sự tăng trưởng của cây sau 8 tuần nuôi cấy được trình bày ở Bảng 3, Hình 4.

Kết quả khảo sát 5 loại môi trường dinh dưỡng khoáng (gồm MS, ½ MS, KC, Vacin &Went và Hyponex®) đã cho thấy các chỉ tiêu về chiều cao cây và số rễ của cây lan *Brassavola nodosa* khác nhau sau 60 ngày nuôi cấy trong điều kiện *in vitro*. Trong đó, môi trường KC (Knudson C, 1946) luôn luôn cho giá trị cao nhất về các chỉ số sinh trưởng (Bảng 3). Chiều cao cây, số rễ và số lá của cây lan *Brassavola nodosa* khi được nuôi cấy trên môi trường KC có giá trị trung bình

(tương ứng 5,44 cm, 4,22 rễ/cây, 4,11 lá/cây) luôn cao hơn so với các môi trường còn lại, khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê (P<0,01). Cây thu được màu xanh tươi và lá mở to.

Bảng 3. *Ảnh hưởng của môi trường khoáng lên sự tăng trưởng chồi lan Brassavola nodosa in vitro*

Môi trường khoáng	Chiều cao cây (cm)	Số rễ (rễ/cây)	Số lá (lá/cây)	Hình thái cây
MS (Murashige & Skoog, 1962)	2,86^{c}	1,11^{b}	4,11^{a}	Cây nhỏ còn non, lá ngắn, rễ ít và ngắn, gốc cây tiết phenol màu đen
½ MS (giảm ½ đa lượng và vi lượng)	3,3^{b}	3,67^{a}	4,22^{a}	Cây xanh tươi, gốc cây tiết phenol màu đen
KC (Knudson C, 1946)	5,44^{a}	4,22^{a}	4,11^{a}	Cây xanh tươi tốt, lá mở to
Vacin &Went (1949)	2,71^{c}	1,44^{b}	3,44^{b}	Cây nhỏ và già cõi, lá ngắn và mở nhỏ, gốc cây tiết phenol màu đen
Hyponex® 20 – 20 – 20 (2 g/l)	3,23^{b}	1,0^{b}	3,67^{b}	Cây nhỏ và già cõi, lá nhỏ và mở nhỏ, có cây chưa ra rễ
$F_{tính}$	163,1**	45,31**	6,57**	
CV (%)	4,33	17,47	5,83	

*Ghi chú **: Trong cùng 1 cột, kí tự theo sau khác nhau (a, b, c…) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức p ≤ 0,05*

Hình 3. *Chồi lan Brassavola nodosa in vitro sau 8 tuần nuôi cấy*

Vì vậy trong thí nghiệm này, môi trường khoáng Knudson C thích hợp cho sự tăng trưởng chồi lan *Brassavola nodosa in vitro*. Các thí nghiệm tiếp theo sẽ sử dụng môi trường khoáng này làm môi trường nền để tiếp tục nghiên cứu.

3.4. Huấn luyện cây in vitro thích nghi với điều kiện tự nhiên

Các cây *in vitro* thu được từ thí nghiệm 4 có chiều cao trung bình từ 4 – 5 cm, 4 – 5 rễ, 4 – 5 lá được trồng ở ngoài vườn ươm. Nhằm xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* hoàn chỉnh, phục vụ cho công tác sản xuất cây giống lan *Brassavola nodosa in vitro*, cây con sau 30 ngày trồng được ghi nhận tỷ lệ sống. Trước khi ra vườn, các bình cây *in vitro* được đưa ra ngoài phòng nuôi, huấn luyện thích nghi ở điều kiện nhiệt độ và ánh sáng tự nhiên (hành lang thoáng gió, ánh sáng khuyếch tán) trong 2 tuần, sau đó cây được gắp nhẹ nhàng ra khỏi bình, rửa cây trong 2 – 3 lần nước sạch, trải cây ra bề mặt thoáng và để cây ráo hết lớp nước bám trên bề mặt cây. Sau 30 ngày trồng kết quả thu được như sau (Hình 5).

Hình 4. *Cây con lan Brassavola nodosa ex vitro ở ngoài vườn ươm*

Sau 4 tuần trồng tại vườn ươm, 100% cây con lan *Brassavola nodosa* phát triển tốt, hình dạng và hình thái cây tương tự như cây mẹ. Cây sinh trưởng bình thường, một số cây hình thành lá mới, đa số cây con đều xuất hiện rễ mới.

4. Kết luận

Xây dựng thành công quy trình nuôi cấy lan *Brassavola nodosa* với các điều kiện cụ thể: (1) Môi trường thích hợp cho sự tạo chồi từ chồi đỉnh của lan *Brassavola nodosa* là môi trường MS bổ sung BA 1,5 mg/L và NAA 0,25 mg/l. (2) Tần suất ngập chìm và thời gian ngập chìm thích hợp cho sự nhân nhanh chồi lan *Brassavola nodosa in vitro* trong hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời RITA® là 6 lần/ngày và thời gian ngập là 1 phút. (3) Môi trường khoáng Knudson C là môi trường thích hợp cho sự tăng trưởng, tạo rễ, tạo cây con *Brassavola nodosa* hoàn chỉnh. (4) 100% cây con ở giai đoạn vườn ươm đều sinh trưởng tốt sau 1 tháng trồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

[1] T. M. D. Nguyen, T. N. Truong, and N. D. Tran, "System relationship between orchid species (Orchidaceae) project on general location," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 22a, pp. 165-175, 2012.

[2] L. H. G. Mengarda, G. P. A. Cola, S. C. D. Oliveira, and A. R. de Freitas, "Multiplication, rooting *in vitro*, and acclimatization of *Brassavola tuberculata* Hook. (Orchidaceae), an orchid endemic to the Brazillian atlantic rainforest," *Bioscience Journal*, vol. 33, no. 3, pp. 730-738, 2017.

[3] 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, no. 1, pp. 127-135, 2018.

[4] N. T. U. Kha, "A study of the micropropagation of *Cymbidium Golden* Elf," *Journal of Ho Chi Minh City University of Education*, no. 64, pp. 86-93, 2014.

[5] D. T. Pham, H. H. Nguyen, and T. C. M. Phi, "Study on *in vitro* Micropropagation of Six hybrids *Hippeastrum esquestre* (Aition) Herb.," *Science And Technology Development Journal*, vol. 12, pp. 392-403, 2014.

[6] M. Berthouly and H. Etienne, "Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation," *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, vol.230, pp. 165-195, 2005.

[7] T. D. Nguyen and T. K. Huynh, "Research on procedure the micropropagation for orchid species Kiem "Phan Tri" (*Cymbidium finlaysonianum* Lindl.)," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 225, no. 8, pp. 479-486, 2020.

[8] S. Krueger, C. Robacker, and W. Simonton, "Cullture of *Amelanchier x grandiflora* in a programmable micropropagation apparatus," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Culture*, vol. 27, pp. 219-226, 1991.

[9] T. V. Bui, *General plant physiology (part II)*. Ho Chi Minh City National University Publishing House, 2002.