

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG *IN VITRO* LAN KIẾM PHAN TRÍ (*Cymbidium finlaysonianum* Lindl.)

Nguyễn Thị Diệp*, Huỳnh Thị Kim

Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ Cao

TÓM TẮT

Lan Kiếm Phan Trí (thuộc họ *Cymbidium*) là loài lan Kiếm Tiên Vũ hoa bán sơn địa lá dài, rất cứng, hoa vàng đột biến rất nổi tiếng của Việt Nam. Trong nghiên cứu nhân giống cây lan Kiếm Phan Trí này, chồi non có chiều dài từ 20 – 30 cm được sử dụng làm vật liệu nuôi cấy khởi đầu. Khi chồi *in vitro* đạt kích thước 2 cm, tách lấy chồi đỉnh để làm vật liệu cho các thí nghiệm. Kết quả cho thấy, trên môi trường MS có bổ sung BA 3 mg/l và NAA 0,5 mg/l cho tỷ lệ mẫu tạo PLBs là 64,44% và số lượng PLBs là 17,2 PLBs/mẫu. Kiểu nuôi cấy bằng hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời RITA® với sự gia tăng trọng lượng PLBs và số chồi tái sinh tương ứng là 18,7 lần và 84,6 chồi. Môi trường khoáng Hyponex® với thành phần N:P:K là 20:20:20 kết hợp với 15 g/l chuối sứ chín thu được 100% chồi ra rễ, chiều cao cây là 6,3 cm và có 3,67 rễ. Tỷ lệ sống của cây giai đoạn vườn ươm sau 1 tháng trồng đạt 95%.

Từ khóa: Lan Kiếm Phan Trí; *Cymbidium*; protocorm-like-bodies (PLBs); hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời RITA®; môi trường khoáng Hyponex®.

Ngày nhận bài: 16/6/2020; Ngày hoàn thiện: 28/7/2020; Ngày đăng: 31/7/2020

RESEARCH ON PROCEDURE THE MICROPROPAGATION FOR ORCHID SPECIES KIEM “PHAN TRI” (*Cymbidium finlaysonianum* Lindl.)

Nguyen Thi Diep*, Huynh Thi Kim

Research & Development Center For High Technology Agriculture

ABSTRACT

The orchid species Kiem Phan Tri (belonging to genus *Cymbidium*) is a species of orchid that grows very hard and long leaves, mutant yellow flowers that have been famous for a long time in Vietnam. In the study of propagating the orchid species Kiem Phan Tri, young shoots with length of 20 - 30 cm were used to the starting culture material. When dormant buds reached 2 cm, their tops were cut and used as experiment materials. The results showed that on MS medium containing 3 mg/l BA and 0.5 mg/l NAA, the percentage of PLBs regeneration from the top of buds was 64.44% and 17.2 PLBs/explant. The type of culture using the RITA® temporary was submerged culture system, with the increase in the PLBs weight and the number of regenerated shoots was 18.7 times and 84.6 shoots respectively. Hyponex® medium with N:P:K consist of 20:20:20 combining with 15 g/L bananas for a rooting rate of 100% showed the shoots height are 6.3 cm with 3.67 roots. Survival rate of plantlets in nursery garden was 95%.

Keywords: The orchid species Kiem Phan Tri; *Cymbidium*; protocorm-like-bodies (PLBs); the RITA® temporary submerged culture system; Hyponex® medium.

Received: 16/6/2020; Revised: 28/7/2020; Published: 31/7/2020

* Corresponding author. Email: nguyenthidiep.bio@gmail.com

1. Mở đầu

Lan Kiếm Phan Trí (tên khoa học là *Cymbidium finlaysonianum* Lindl.) thuộc dòng lan Kiếm Tiên Vũ hoa bán sơn địa lá dài rất cứng, hoa vàng đột biến rất nổi tiếng từ lâu của Việt Nam, cây khỏe và có sức sống tốt, khi trồng đạt củ to cùng với bản lá to. Cây có giá trị sưu tầm cao. Về mặt kinh tế, *Cymbidium* là chi hoa lan cắt cành có giá trị rất cao trong các loài hoa cắt cành và luôn được ưa chuộng trên thị trường thế giới, hoa to, nhiều, màu sắc đẹp, cành hoa dài và lâu tàn. Thời gian cây ra giả hành mới lâu, thường 3 – 4 tháng mới ra được 1 giả hành mới nên hiện nay cây lan này rất có giá trị sưu tầm trên thị trường. Cho đến nay các nghiên cứu trong và ngoài nước về nhân giống *in vitro* của chi *Cymbidium* đã được thực hiện cũng tương đối nhiều như Dương Tấn Nhựt và cộng tác viên (ctv) (2006), Hoàng Thị Nga và ctv (2008), Kha Nữ Tú Uyên (2013), Morel (1960), Nguyễn Quang Thạch và ctv (2004), Phan Xuân Huyền và ctv (2004) đã sử dụng chồi non các cây *Cymbidium* sp. để thực hiện nhân giống [1]-[6]; Chang và ctv (2000) nhân giống thông qua rễ phát sinh từ mô sẹo [7]; Chen và ctv (2015) tái sinh cây từ hạt chưa trưởng thành [8]. Thế nhưng, vẫn chưa có nghiên cứu nhân giống cho cây lan Kiếm Phan Trí. Chính vì vậy, việc ứng dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật nhằm nhân nhanh một số lượng lớn cây giống lan Kiếm vàng Phan Trí trong thời gian ngắn và ổn định về chất lượng, đáp ứng thị trường tiêu thụ là hướng nghiên cứu mang lại nhiều tiềm năng. Những cây mẹ có đặc điểm có nổi trội hoặc chống chịu tốt với điều kiện môi trường được nhân lên gấp nhiều lần nhờ sử dụng phương pháp nuôi cấy *in vitro*. Trong nghiên cứu này, nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây lan Kiếm vàng Phan Trí, vật liệu được sử dụng để nhân giống là chồi non lan Kiếm vàng Phan Trí.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Cây lan Kiếm Phan Trí *Cymbidium finlaysonianum* Lindl. 2 năm tuổi mang các giả hành non khoảng 2 - 3 tháng tuổi, cao khoảng 20 – 30 cm được sử dụng để làm vật liệu ban đầu. Mẫu được mua tại Vườn lan

rừng Kiều Mai ở xã An Phú, huyện Bình Long, tỉnh Bình Phước (mẫu đã được phân tích và định danh tại Viện Sinh học nhiệt đới để đảm bảo tính chính xác. Đây là cây lan Kiếm Phan Trí – Hình 1). Mẫu được khử trùng bằng dung dịch Javel Mỹ Hảo thương mại (5% NaClO) với tỷ lệ Javel: nước là 2:1 có bổ sung 2 - 3 giọt Tween 20 trong 30 phút. Tách bớt bao lá, sau đó lặt lại với dung dịch HgCl₂ 0,1% có bổ sung 2 - 3 giọt Tween trong 5 phút rồi rửa lại 3 – 5 lần với nước cất khử trùng. Cấy vào môi trường nuôi cấy để theo dõi, sau 4 tuần, loại bỏ mẫu nhiễm, mẫu đã phát triển các chồi bên khoảng 2 cm tiến hành tách bỏ hết lá và phần chồi đỉnh có kích thước khoảng 2 mm dùng để bố trí thí nghiệm tạo PLBs.



Hình 1. Mẫu chồi non cây lan Kiếm Phan trí dùng để khử trùng

Môi trường nền sử dụng trong các thí nghiệm là môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) có bổ sung đường sucrose 30 g/l, agar 8 g/l và các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (ĐHSTTV) khác nhau tùy theo mục đích thí nghiệm. Các môi trường được điều chỉnh pH ở mức 5,7 – 5,8 (bằng KOH hoặc HCl) trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút, áp suất 1 atm.

2.1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ BA kết hợp với NAA lên sự tạo PLBs từ chồi đỉnh: Trên môi trường MS, có bổ sung BA (nồng độ thay đổi 1; 1,5; 2; 2,5; 3 mg/l) và NAA (nồng độ 0,2; 0,5 mg/l). Vật liệu là các chồi *in vitro* cao 2 cm, tách các lớp lá và bẹ lá

của chồi *in vitro* để lộ chồi đỉnh, phần chồi đỉnh có chiều dài khoảng 2 mm được dùng để bố trí thí nghiệm. Bố trí 45 mẫu/nghiệm thức.

2.2. Khảo sát ảnh hưởng của phương pháp nuôi cấy lên sự tăng sinh PLBs và tái sinh chồi từ PLBs: Các kiểu nuôi cấy được sử dụng cho thí nghiệm này gồm môi trường thạch, môi trường lỏng tĩnh, môi trường lỏng lắc (tốc độ lắc 90 vòng/phút) và hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời RITA® (với tần suất ngập 3 phút sau mỗi 4 giờ) có bổ sung BA 1 mg/l, nước dừa 100 ml/l. Vật liệu là sử dụng các cụm PLB có đường kính khoảng 0,5 cm (khoảng 5 PLB/cụm). Bố trí 3 lần lặp lại/nghiệm thức, mỗi lần lặp lại cấy 3 bình, mỗi bình cấy 1 g PLB.

2.3. Khảo sát ảnh hưởng của môi trường khoáng và hàm lượng chuỗi lên sự tăng trưởng chồi lan *in vitro*: Trên các môi trường khoáng MS, ½ MS (giảm đa lượng và vi lượng), KC (Knudson C, 1946), Hyponex® 20 – 20 – 20* (2 g/l) có bổ sung chuỗi sulfur chín (hàm lượng thay đổi 15; 30; 45 g/l), nước dừa 100 ml/l, NAA 0,5 mg/l.

2.4. Khảo sát tỷ lệ sống của cây lan ở giai đoạn vườn ươm sau 1 tháng trồng: Cây con được bỏ bằng vỏ xơ dừa đã qua xử lý, trồng

trong vườn ươm có che mưa để khảo sát tỷ lệ sống của cây con *ex vitro*. Điều kiện trồng tại vườn ươm có ánh sáng 20 - 25% và ẩm độ 60 - 65%. Trong tuần lễ đầu, ngày tưới 2 lần vào các thời điểm 8h30 và 15h, mỗi lần tưới trong khoảng 2 phút, 0,5 lít/m², tuần kế tiếp 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.

2.5. Phương pháp lấy số liệu: Các mẫu được theo dõi sau 60 ngày nuôi cấy với các chỉ tiêu theo dõi như: Tỷ lệ mẫu tạo PLBs (%), số PLBs (PLBs/mẫu), chiều cao cây, số rễ, gia tăng trọng lượng tươi (g/cây), tỷ lệ mẫu ra rễ (%), số chồi phát sinh (chồi/mẫu).

2.6. Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu thu thập được xử lý thống kê bằng phần mềm excel. Sử dụng toán thống kê để xác định các chỉ số thống kê như: trung bình mẫu, phương sai, độ lệch chuẩn và sai số trung bình mẫu với $n \geq 30$, $\alpha \leq 0,05$. So sánh giữa các giá trị trung bình bằng thuật toán giới hạn sai khác nhỏ nhất LSD0,05.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ BA kết hợp với NAA lên sự tạo PLBs từ chồi đỉnh

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ BA kết hợp với NAA lên sự tạo PLBs từ chồi đỉnh lan Kiếm Phan Trĩ *in vitro* sau 60 ngày nuôi cấy

Nghiem thức	Nồng độ BA (mg/l)	Nồng độ NAA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo PLBs (%)	Số PLBs/mẫu	Hình thái PLBs
ĐC	0	0	0 ^e	0 ^f	
NT1	1,0		0 ^e	0 ^f	
NT2	1,5		31,11 ^d	3,27 ^e	PLBs nhỏ, màu xanh, một số mẫu phát sinh thành chồi
NT3	2,0	0,2	37,78 ^c	4,82 ^d	PLBs nhỏ, màu xanh, một số mẫu phát sinh thành chồi
NT4	2,5		37,78 ^c	5,04 ^d	PLBs nhỏ, màu vàng xanh, dạng rời
NT5	3,0		55,56 ^b	10,6 ^b	PLBs to, màu vàng xanh, dạng rời
NT6	1,0		0 ^e	0 ^f	
NT7	1,5		42,22 ^c	3,53 ^e	PLBs nhỏ, màu xanh, một số mẫu phát sinh thành chồi
NT8	2,0	0,5	37,78 ^c	6,91 ^c	PLBs nhỏ, màu vàng xanh, dạng rời
NT9	2,5		40 ^c	9,58 ^b	PLBs to, màu vàng xanh, dạng rời
NT10	3,0		64,44 ^a	17,2 ^a	PLBs to, màu vàng xanh, dạng rời
F _{tính}			157,4 ^{**}	161,89 ^{**}	
CV (%)			9,74	13,02	

Ghi chú: **: Khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,01$; a, b, c: Sự khác biệt của các nghiệm thức theo trắc nghiệm phân hạng Duncan

Đỉnh chồi là vùng mô có chứa mô phân sinh ngọn. Mô phân sinh ngọn chứa những tế bào có kích thước nhỏ, đẳng kính, không có các khoảng gian bào, giàu tế bào chất, nhân to và hạch nhân rõ [9]. Những tế bào này giữ nhiệm vụ phân chia tạo ra các tế bào dẫn xuất và phân hóa từ từ tạo ra các tế bào, mô, cơ quan chức năng. Các chồi đỉnh của chồi *in vitro* lan Kiếm Phan Trí có kích thước 2 mm được dùng để bố trí thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ BA kết hợp với NAA lên sự tạo PLBs. Sau 60 ngày nuôi cấy kết quả tạo PLBs được trình bày ở bảng 1 và hình 2.



a) ĐC



b) BA 3 mg/L và NAA

Hình 2. PLBs tạo thành từ chồi đỉnh lan Kiếm Phan trí *in vitro* sau 60 ngày nuôi cấy

Theo kết quả ở bảng 1, một số chồi đỉnh cảm ứng tái sinh thành PLBs (tỷ lệ mẫu tái sinh cao nhất là 64,44%) và một số chồi đỉnh cảm ứng tạo thành chồi hoặc mẫu bị vàng nâu sau đó bị đen và chết (mẫu không tái sinh). Những nghiệm thức bổ sung NAA nồng độ 0,5 mg/l luôn cho kết quả tối ưu hơn so với các nghiệm thức còn lại, trong đó nghiệm thức ứng với nồng độ BA 3 mg/l cho kết quả tốt nhất với tỷ lệ mẫu tạo PLBs là 64,44% và số lượng PLBs tạo thành trên mỗi mẫu là 17,2 PLBs/mẫu, ở nghiệm thức này PLBs to, màu vàng xanh, dạng rời. Theo nghiên cứu của Kha Nữ Tú Uyên (2013) [3] cho thấy, ảnh hưởng của BA và NAA đến sự tái sinh PLB *Cymbidium* cụ thể là tỷ lệ mẫu tái sinh PLBs cao nhất khi nuôi cấy chồi đỉnh trên môi trường MS bổ sung BA 2,5 mg/L và NAA 0,2 mg/L. Theo nghiên cứu của Phan Xuân Huyền và ctv (2004) [6], sự hình thành PLB từ đỉnh sinh trưởng địa lan *Cymbidium* sp. trong môi trường MS có bổ sung nồng độ BA 2 mg/L và NAA 0,2 mg/L tối ưu nhất. Điều này khá tương đồng với kết quả của thí nghiệm, tức là BA và NAA có khả năng kích thích sự tái sinh PLB từ chồi đỉnh lan Kiếm vàng Phan trí. Vì vậy trong thí nghiệm này, môi trường thích hợp cho sự tạo PLBs từ chồi đỉnh lan Kiếm Phan Trí *in vitro* là môi trường MS có bổ sung BA 3 mg/l và NAA 0,5 mg/l.

3.2. Ảnh hưởng của phương pháp nuôi cấy lên sự tăng sinh PLBs và tái sinh chồi từ PLBs

Sự phát triển của thực vật trong nuôi cấy *in vitro* phụ thuộc vào mẫu cấy và sự tương tác giữa mẫu cấy với môi trường nuôi cấy. Trên môi trường bán rắn thường xảy ra hiện tượng mẫu cấy tiết ra các hợp chất phenol làm môi trường và mẫu cấy hóa nâu dẫn đến sự giảm sức sống và sự chết của mẫu cấy. Phương pháp để loại trừ các ảnh hưởng tiêu cực này là sử dụng các hệ thống nuôi cấy lỏng.

Từ kết quả ghi nhận được ở bảng 2 và hình 3 cho thấy, sự gia tăng trọng lượng tươi PLBs và số chồi tái sinh trung bình/gam PLBs ban đầu của lan Kiếm Phan Trí chịu ảnh hưởng bởi các phương pháp nuôi cấy khác nhau trong điều kiện *in vitro*. Trong môi trường nuôi cấy lỏng tĩnh và môi trường lỏng lắc đều không kích thích sự gia tăng trọng lượng tươi PLBs và số chồi tái sinh sau 60 ngày nuôi cấy, thậm chí còn thấp hơn so với việc nuôi cấy PLBs trong môi trường thạch (Đối chứng) (bảng 2). Các cụm PLBs trong môi trường lỏng tĩnh và lỏng lắc bị hiện tượng thủy tinh thể (hình 3). Điều này có thể do trong môi trường lỏng, mẫu bị ngập hoàn toàn trong môi trường kết hợp với sự trao đổi khí kém làm giảm khả năng tăng sinh.

Bảng 2. Ảnh hưởng của phương pháp nuôi cấy lên sự tăng sinh PLBs và tái sinh chồi lan Kiếm Phan Trí *in vitro* sau 60 ngày nuôi cấy

Nghiệm thức	Phương pháp nuôi cấy	Gia tăng trọng lượng tươi PLB	Hình thái PLB	Số chồi	Hình thái chồi
ĐC	Môi trường thạch	5,56 ^b	PLBs to tròn, màu vàng đậm, mẫu có tiết phenol	20,73 ^b	Chồi ngắn nhỏ, màu xanh đậm
NT1	Môi trường lỏng tĩnh	3,91 ^c	PLBs xanh nhạt, mỏng nước	7,82 ^d	Chồi nhỏ chưa có lá mở, màu xanh nhạt
NT2	Môi trường lỏng lắc (tốc độ lắc 90 vòng/phút)	5,71 ^b	PLBs vàng nhạt, mỏng nước	14,76 ^c	Chồi nhỏ chưa có lá mở, màu vàng nhạt
NT3	Hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời Rita với tần suất ngập 3 phút sau mỗi 4 giờ	18,7 ^a	PLBs xanh nhạt, to, có xu hướng tái sinh chồi	84,06 ^a	Chồi có 1-2 lá mở, xanh nhạt
F _{tính}		2843,44 ^{**}		9885,07 ^{**}	
CV (%)		2,61		1,94	

Ghi chú: **: Khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,01$; a, b, c: Sự khác biệt của các nghiệm thức theo trắc nghiệm phân hạng LSD



a) ĐC



b) NT1



c) NT2



d) NT3

Hình 3. Chồi lan Kiếm Phan Trí *in vitro* ở các kiểu nuôi cấy sau 60 ngày nuôi cấy

Ngược lại, trong hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời Rita với tần suất ngập 3 phút sau mỗi 4 giờ thì sự gia tăng trọng lượng PLBs và số chồi tái sinh luôn đạt giá trị trung bình cao nhất, tương ứng với 18,7 lần và 84,6 chồi, khác biệt rất có ý nghĩa so với các nghiệm thức khác ($P < 0,01$) (hình 3). Hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời có cung cấp khí sẽ tạo điều kiện thông thoáng và làm mới vùng không khí trong bình nuôi sau mỗi chu kỳ chìm ngập, không khí được thay mới trong quá trình chất lỏng di chuyển và do một lượng khí mới được cấp bởi máy bơm khí. Trong điều kiện cấp khí bắt buộc, hàm lượng khí và độ ẩm tương đối sinh ra trong bình nuôi có thể ảnh hưởng tích cực đến việc nuôi cấy. Độ ẩm tương đối sinh ra do ảnh hưởng của sự trao đổi khí có tác dụng kích thích sự thoát

hoi nước ở thực vật, giúp cây *in vitro* có khả năng thích nghi tốt hơn khi chuyển ra môi trường *ex vitro*. Một đặc điểm khác giúp gia tăng hiệu quả khi nuôi cấy trong hệ thống RITA[®] là các chất độc được thải ra từ mô thực vật trong quá trình nuôi cấy sẽ khuếch tán đều vào môi trường làm giảm nồng độ và mẫu cấy không phải tiếp xúc thường xuyên với các hợp chất này, từ đó nâng cao hiệu quả tăng sinh PLBs và tái sinh chồi. Theo nghiên cứu của Nguyễn Ngọc Quỳnh và ctv (2008) [10] đã ứng dụng hệ thống bioreactor dạng ngập chìm tạm thời trong nhân chồi và PLB hoa lan *Dendrobium* và *Phalaenopsis*, kết quả thu được lượng chồi, PLB cao hơn 3 đến 20 lần so với nuôi cấy trên môi trường thạch, chồi khô, PLB có màu xanh đậm. Như vậy trong thí nghiệm này, kiểu nuôi cấy thích hợp để

tăng hiệu quả tăng sinh PLBs và tái sinh chồi là hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời RITA® với tần suất ngập 3 phút sau mỗi 4 giờ.

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của môi trường khoáng và hàm lượng chuối lên sự tăng trưởng chồi lan in vitro

Sự sinh trưởng của thực vật phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau. Thành phần môi trường nuôi cấy là một trong những yếu tố quan trọng nhất trong sự tăng trưởng và phát sinh hình thái của tế bào và mô thực vật trong nuôi cấy mô. Thành phần môi trường nuôi cấy tế bào và mô thực vật thay đổi tùy theo loài và bộ phận nuôi cấy. Đối với cùng một mẫu cây nhưng tùy theo mục đích thí nghiệm thì thành phần môi trường cũng sẽ thay đổi [11].

Có nhiều dạng dịch chiết tự nhiên đã được bổ sung vào môi trường nuôi cấy mô như dịch chiết đậu nành, dịch chiết cà chua, khoai tây, nước dừa, chuối... sẽ cung cấp các amino acid, vitamin và một số nguyên tố đa vi lượng có lợi khác cho sự tăng trưởng của cây trồng giúp cho mẫu cây in vitro phát triển tốt hơn.

Chồi có kích thước đồng đều từ 1,5 - 2 cm nuôi cấy trên môi trường có thành phần khoáng và hàm lượng chuối khác nhau. Sau 60 ngày nuôi cấy kết quả thu được về sự tăng trưởng chồi lan Kiếm vàng Phan Trí in vitro được trình bày ở bảng 3, bảng 4, hình 4 và hình 5.

Chiều cao chồi và số rễ của chồi lan Kiếm Phan Trí khi được nuôi cấy trên môi trường KC (Knudson C, 1946) có giá trị trung bình thấp hơn so với các môi trường dinh dưỡng khoáng khác. Trong đó, môi trường Hyponex® 20 – 20 – 20 (2 g/l) cho giá trị trung bình cao nhất về các chỉ tiêu sinh trưởng, khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,01$) (bảng 3 và bảng 4). Vì vậy, môi trường dinh dưỡng khoáng Hyponex® 20 – 20 – 20 (2 g/l) được lựa chọn là môi trường nuôi cấy giúp chồi sinh trưởng tốt về chiều cao cây (trung bình đạt 6,3 cm) và số rễ (3,67 rễ/cây) (hình 4).

Bảng 3. Sự tăng trưởng về chiều cao của chồi lan Kiếm Phan Trí in vitro sau 60 ngày nuôi cấy

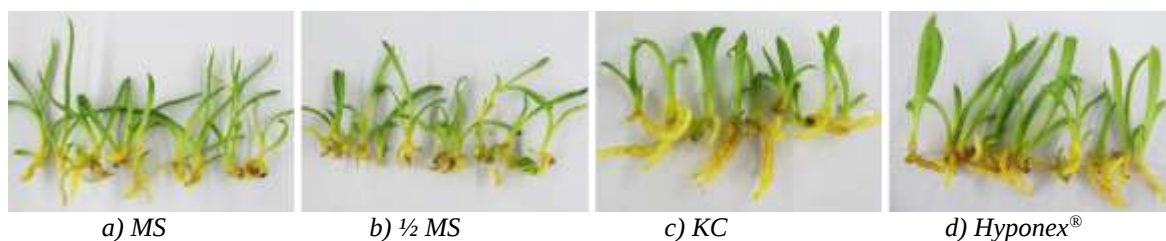
Môi trường khoáng – Yếu tố A	Hàm lượng chuối (g/l) – Yếu tố B				Trung bình yếu tố A
	0	15	30	45	
MS (Murashige & Skoog, 1962)	3,51 ^{efgh}	3,82 ^{defg}	3,32 ^{gh}	3,1 ^h	3,44 ^B
½ MS (giảm ½ đa lượng và vi lượng)	3,42 ^{fgh}	3,93 ^{cdef}	3,0 ^{hi}	3,06 ^{hi}	3,35 ^B
KC (Knudson C, 1946)	3,98 ^{cde}	4,18 ^{cd}	3,4 ^{gh}	2,58 ⁱ	3,53 ^B
Hyponex® 20 – 20 – 20	5,52 ^b	6,3^a	4,38 ^c	3,71 ^{defg}	4,98 ^A
Trung bình yếu tố B	4,11 ^B	4,56 ^A	3,52 ^C	3,11 ^D	
$F_{tính}$	$F_{tính A}=91,39^{**}$, $F_{tính B}=62,31^{**}$, $F_{tính AB}=6,47^{**}$				
CV (%)	7,29				

Ghi chú: **: Khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,01$; a, b, c: Sự khác biệt của các nghiệm thức theo trắc nghiệm phân hạng LSD

Bảng 4. Sự tăng trưởng về rễ của chồi lan Kiếm Phan Trí in vitro sau 60 ngày nuôi cấy

Môi trường khoáng – Yếu tố A	Hàm lượng chuối (g/l) – Yếu tố B				Trung bình yếu tố A
	0	15	30	45	
MS (Murashige & Skoog, 1962)	1,78 ^{bc}	1,44 ^{bdce}	1,22 ^{def}	1,33 ^{cde}	1,44 ^{BC}
½ MS (giảm ½ đa lượng và vi lượng)	1,56 ^{bdce}	1,78 ^{bc}	1,67 ^{bcd}	1,11 ^{ef}	1,53 ^B
KC (Knudson C, 1946)	1,56 ^{bdce}	1,33 ^{cde}	1,22 ^{def}	0,89 ^f	1,25 ^C
Hyponex® 20 – 20 – 20	3,44 ^a	3,67^a	1,89 ^b	1,56 ^{bdce}	2,64 ^A
Trung bình yếu tố B	2,08 ^A	2,06 ^A	1,5 ^B	1,22 ^C	
$F_{tính}$	$F_{tính A}=84,82^{**}$, $F_{tính B}=38,93^{**}$, $F_{tính AB}=11,63^{**}$				
CV (%)	13,76				

Ghi chú: **: Khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,01$; a, b, c: Sự khác biệt của các nghiệm thức theo trắc nghiệm phân hạng LSD



Hình 4. Chồi lan Kiềm Phan Trí in vitro ở các môi trường khoáng khác nhau sau 60 ngày nuôi cấy



Hình 5. Chồi lan Kiềm Phan Trí in vitro ở các hàm lượng chuối khác nhau sau 60 ngày nuôi cấy

Hàm lượng chuối ảnh hưởng lớn đến sự tăng trưởng về chiều cao cây và số rễ in vitro. Ở nghiệm thức bổ sung hàm lượng chuối 15 g/l, các chỉ tiêu về chiều cao cây, tỷ lệ mẫu tạo rễ và số rễ đạt giá trị cao nhất so với các nghiệm thức còn lại, khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,01$). Trên môi trường khoáng Hyponex® 20 – 20 – 20 (2 g/l), sau 14 ngày nuôi cấy, nghiệm thức không bổ sung chuối thì chỉ mới có 1 – 2 chồi bắt đầu ra rễ, còn ở tất cả các môi trường có bổ sung chuối thì các chồi đều tạo rễ và chồi có màu xanh tươi giống chồi mẫu ban đầu và có khả năng sinh trưởng bình thường. Khi không bổ sung chuối hoặc bổ sung với hàm lượng cao (30 và 45 g/l) cây tăng trưởng kém về chiều cao và đạt giá trị thấp hơn (bảng 3 và hình 4). Theo nghiên cứu của Kha Nữ Tú Uyên (2013) [3] có bổ sung chuối sử dụng trong môi trường sinh trưởng của lan *Cymbidium*, cụ thể là môi trường khoáng KC bổ sung chuối 20 g/L + 100 mL/L nước dừa + than hoạt tính 1 g/L thích hợp cho sự phát triển của cây lan. Theo nghiên cứu của Đặng Thị Thắm (2018) [12], môi trường nuôi cấy MS bổ sung chuối chín 60 g/L (22,4 chồi/mẫu; chiều cao chồi 2 cm) phù hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của chồi cây lan Nhất điểm hoàng (*Dendrobium heterocarpum* Lindl.).

Vì vậy, trong thí nghiệm này, môi trường khoáng thích hợp cho sự tăng trưởng của chồi

lan Kiềm Phan Trí in vitro là môi trường khoáng Hyponex® với thành phần N:P:K là 20:20:20 (2 g/l) kết hợp với hàm lượng chuối sử dụng 15 g/l.

3.4. Tỷ lệ sống của cây lan ở giai đoạn vườn ươm sau 1 tháng trồng



Hình 6. Cây con lan Kiềm Phan Trí ex vitro sau 1 tháng nuôi trồng ở ngoài vườn ươm

Khảo sát tỷ lệ sống của cây ở giai đoạn vườn ươm sau 30 ngày trồng nhằm xây dựng quy trình nhân giống in vitro hoàn chỉnh, phục vụ cho công tác sản xuất cây giống lan Kiềm Phan Trí cấy mô. Các bình cây in vitro đủ tiêu chuẩn ra vườn ươm được đưa ra ngoài phòng nuôi, huấn luyện thích nghi ở điều kiện nhiệt độ và ánh sáng tự nhiên trước khi trồng. Kết quả được ghi nhận sau 30 ngày trồng tại vườn ươm là: 95% cây con lan Kiềm Phan Trí phát triển tốt, một số cây ra lá mới, hình dạng cây và sự sinh trưởng của cây bình thường, hình thái cây bình thường, đồng thời cây có xuất hiện rễ mới.

4. Kết luận

Xây dựng thành công quy trình nuôi cấy lan Kiếm Phan Trí với các điều kiện cụ thể: (1) Môi trường MS có bổ sung BA 3 mg/L, NAA 0,5 mg/L là thích hợp cho sự tạo PLBs từ chồi đỉnh. (2) Kiểu nuôi cấy hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời RITA[®] với tần suất ngập 3 phút sau mỗi 4 giờ có bổ sung 1 mg/L BA, 100 ml/L nước dừa là thích hợp để tăng sinh PLBs và tái sinh chồi từ PLBs. (3) Môi trường khoáng Hyponex[®] với thành phần N:P:K là 20:20:20 (2 g/L) kết hợp với hàm lượng chuỗi sứ chín 15 g/L thích hợp cho sự tăng trưởng và tạo rễ của chồi lan Kiếm Phan Trí *in vitro*. (4) Cây con *in vitro* khỏe mạnh và phát triển tốt sau 1 tháng trồng thử nghiệm ngoài vườn ươm (tỷ lệ sống sót 95%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1]. T. N. Duong, H. N. L. Nguyen, N. T. Tong, Q. L. Vu, V. T. V. Bui, and X. H. Phan, "The effect of culture system on the formation of a protocorm-like body (protocorm-like body) and the study to shorten the growth time of *Cymbidium* sp. *in vitro* culture," *Journal of Biotechnology*, vol. 4, no. 3, pp. 353-362, 2006.
- [2]. T. N. Hoang, Q. T. Nguyen, D. T. Do, and M. T. Hoang, "Establish a process of rapid propagation of Hong Hoang *Cymbidium* (*Cymbidium Irldoldes*) using tissue culture techniques," *Journal of Science and Development*, vol. 4, no. 4, pp. 387-394, 2008.
- [3]. 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.
- [4]. G. M. Morel, "Producing virus-free *Cymbidium*," *Am. Orchid Soc. Bull.*, vol. 29, pp. 495-497, 1960.
- [5]. Q. T. Nguyen, T. N. Hoang, T. L. A. Nguyen, and T. M. Le, "Research on *in vitro* propagation of commercial *Cymbidium* "Miss Kim," *Journal of Agriculture - Rural - Environment*, no. 11, pp. 1503-1505, 2004.
- [6]. X. H. Phan, T. A. Nguyen, T. L. Nguyen, T. D. H. Nguyen, V. K. Dinh, and T. N. Duong, "Easter and fast multiplication *Cymbidium* cv. by growing apex culture," *Journal of Biotechnology*, vol. 26, pp. 48-54, 2004.
- [7]. C. Chang, and W. Chang, "Micropropagation of *Cymbidium ensifolium* var. *Misericors* through callus-derived rhizomes," *In vitro cellular and developmental biology - plant*, vol. 36, no. 6, pp. 517-520, 2000.
- [8]. Y. Chen, X. Liu, and Y. Liu, "In vitro plant regeneration from the immature seeds of *Cymbidium faberi*," *Plant cell, tissue and organ culture*, vol. 81, no. 2, pp. 247-251, 2005.
- [9]. T. V. Bui, *General plant physiology (part II)*. Ho Chi Minh City National University Publishing House, 2002.
- [10]. N. Q. Nguyen, *Application of temporary submerged culture systems for rapid multiplication of PLB and orchid sprouts Dendrobium, Phalaenopsis*. Southern Institute of Agricultural Science and Technology, 2008.
- [11]. D. L. Nguyen, T. T. T. Le, *Cell technology*. Ho Chi Minh City National University Publishing House, 2006.
- [12]. 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.