

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* LAN THẠCH HỘC ĐÙI GÀ (*Dendrobium nobile* Lindl.)

Nguyễn Thị Hải Yến*, Trần Ngọc Nam
Trường Đại học Khoa học - ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Lan Thạch hộc Đùi gà (*Dendrobium nobile* Lindl.) cho hoa đẹp và có giá trị dược liệu. Hiện nay, loài lan rừng này đang bị khai thác quá mức có nguy cơ cạn kiệt trong tự nhiên, vì vậy việc bảo tồn là rất cần thiết. Trong nghiên cứu này, các yếu tố ảnh hưởng đến sự tái sinh protocorm, sinh trưởng và phát triển chồi, sự ra rễ *in vitro* và sự sống sót và sinh trưởng cây con đã được khảo sát. Kết quả cho thấy môi trường Murashige & Skoog bổ sung saccharose 10g/l; than hoạt tính 1g/l; BAP 1 mg/l và nước dừa 100ml/l thích hợp cho sự tái sinh protocorm; Môi trường thích hợp cho sinh trưởng và phát triển chồi lan Thạch hộc Đùi gà *in vitro* là MS bổ sung đường saccharose 25g/l; than hoạt tính 1g/l; BAP 1mg/l 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 lên đến 20,5 mm, số rễ trung bình/chồi đạt 7,32; rễ mập, dài khỏe). Sau 60 ngày chuyển cây con *in vitro* trồng trong nhà lưới trên giá thể hỗn hợp mùn cưa hoai mục và vụn dớn tỉ lệ 1:1 cho kết quả tốt nhất (tỷ lệ cây sống đạt 92%; cây to khỏe ra rễ nhiều, số chồi mới hình thành đạt 2,86 chồi/cây sau 2 tháng).

Từ khóa: cây thảo dược; *Dendrobium nobile* Lindl.; nhân giống *in vitro*; nuôi cấy protocorm; vụn dớn

Ngày nhận bài: 27/8/2020; Ngày hoàn thiện: 12/10/2020; Ngày đăng: 21/10/2020

STUDY ON *IN VITRO* PROPAGATION OF *Dendrobium nobile* Lindl.

Nguyen Thi Hai Yen*, Tran Ngoc Nam
TNU - University of Sciences

ABSTRACT

Dendrobium nobile Lindl. gives beautiful flowers and has medicinal value. Currently, this natural orchid plant in any forest is overexploited, leading to depletion, therefore, it should be preserved. In this study, the effects of factors on protocorm regeneration, shoot growth and development, rooting, and the survival and growth of seedlings were investigated. Results showed that Murashige and Skoog medium supplemented including sucrose 10 gL⁻¹; activated charcoal 1 gL⁻¹; BAP 1 mgL⁻¹ and coconut water 100 mL⁻¹ were the best for protocorm regeneration. A suitable medium for the growth and development of orchid shoots *Dendrobium nobile* Lindl. *in vitro* was Murashige and Skoog medium supplemented including saccharose 25 gL⁻¹; activated charcoal 1 gL⁻¹; BAP 1 mgL⁻¹ and potato 50 gL⁻¹. Additional volume of 0.5 mgL⁻¹ NAA to the culture medium promoted the best root formation (root length up to 20.5 mm, number of roots/shoot reaching 7.32, long strong roots). Seedlings were grown in a mesh house on a mixture of decomposed sawdust and crumbs at the ratio of 1: 1 which provided the best results after 60 days (rate of living plants reaching 92%; strong trees with many roots, the number of newly formed shoots reaching 2.86 buds/tree).

Keywords: herbal plants, *Dendrobium nobile* Lindl., *in vitro* propagation; protocorm regeneration; crumbs

Received: 27/8/2020; Revised: 12/10/2020; Published: 21/10/2020

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

1. Mở đầu

Lan Hoàng thảo (*Dendrobium*) là một chi có số lượng loài đông đảo vào bậc nhất trong họ lan với khoảng 1400 loài trên toàn thế giới, chủ yếu phân bố ở Đông Nam Á và các đảo thuộc Philippine, Malaysia, Indonesia, Papua New Guinea, Đông Bắc Australia. Ở Việt Nam có 107 loài và 1 thứ, phân bố ở các vùng núi từ Bắc vào Nam và trên một số đảo ven biển [1]. Phong lan không chỉ có tác dụng trang trí cho không gian sống mà nhiều loài còn có giá trị dược liệu điển hình như thạch học tía (*D. officinale* Kimura et Migo) được dùng chữa lao, sốt nóng, khô cổ, ho, đau họng, nóng trong, đau lưng, chân tay nhức mỏi, ra mồ hôi trộm, thiếu năng sinh dục ở nam giới, di tinh, đau dạ dày, viêm ruột [2] [3]; Lan kim tuyến (*A. setaceus*) được dùng trong điều trị các bệnh như đau nhức xương khớp, phong tê thấp, chấn thương, suy nhược thần kinh và giúp tăng sức đề kháng [4]; và một số loài lan khác như Lan phi điệp (*D. anosmum*), Thạch học Đùi gà (*D. nobile* Lindl.) trị các chứng suy nhược cơ thể, thần kinh suy nhược, đau họng và yếu sinh lý ở nam giới...

Hiện nay, lan rừng đang bị khai thác cạn kiệt do nhu cầu chơi hoa cũng như nhu cầu thu hái làm thuốc tăng cao. Tình trạng khai thác không kiểm soát đối với hầu hết các loài lan rừng ở nước ta đang xảy ra mạnh ở nhiều vùng như Tây Nguyên, Lâm Đồng và các tỉnh phía Bắc như Hà Giang, Yên Bái, Thái Nguyên... Hầu hết các loài lan rừng Việt Nam đều được xếp vào danh mục sách đỏ cần được 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 (để chồi hàng năm), nhưng hệ số nhân giống thấp. Tuy quả lan có rất nhiều hạt nhưng trong tự nhiên lại khó nảy mầm vì không có nội nhũ, muốn nảy mầm được phải có sự cộng sinh của nấm [6]. Hiện nay, 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 về nhân giống chi *Dendrobium*, trong đó nghiên cứu về nhân giống các loài *Dendrobium* lai chiếm tỉ lệ cao nhất (26,4%), tiếp đến là các loài Thạch học (*D. candidum*, *D. officinale*) (10,3%) và thấp nhất là một số loài lan rừng gồm *D. primulinum*, *D. litiiflorum*, *D. densiflorum*, *D. crumenatum* (2,3%) [7], *Dendrobium chrysanthum* [8]. Ở Việt Nam, nhân giống *Dendrobium* đã được tiến hành trên một số loài như: *D. officinale* Kimura et Migo [9]; *D. litiiflorum* [10], *D. heterocarpum* Lindl [11]. Để góp phần bảo tồn và nhân giống lan rừng làm thuốc, chúng tôi tiến hành nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài lan Thạch học Đùi gà (*D. nobile* Lindl.)

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Thạch học đùi gà (*D. nobile* Lindl.) được khai thác từ rừng thuộc địa bàn tỉnh Hòa Bình. Mẫu thân và quả được thu vào tháng 10, 11. Quả còn xanh hoặc già nếu chưa mở đều sử dụng để phục vụ nuôi cấy *in vitro*.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp khử trùng mẫu

Đối với mẫu thân sau khi thu về được rửa bằng xà phòng loãng, tráng nước cất vô trùng rồi đưa vào box cấy khử trùng theo các bước: (1) Khử trùng sơ bộ bằng cồn 70% trong 30 giây; (2) Khử trùng bằng javen 30% trong 10, 20 phút hoặc thủy ngân clorua ($HgCl_2$) 0,1% trong 8, 10 phút; (3) Rửa mẫu bằng nước cất vô trùng, đưa mẫu lên giấy thấm và cắt những khúc có mắt ngủ đưa vào môi trường nuôi cấy.

Đối với mẫu hạt: (1) Trước khi khử trùng, quả lan được rửa sạch bằng nước xà phòng loãng, sau đó khử trùng bằng cồn 70% trong 30 giây rồi sử dụng thủy ngân clorua ($HgCl_2$) 0,1% với hai cách xử lý khác nhau: khử trùng một lần trong 10 phút và hai lần với thời gian lần một 8 phút, lần hai 5 phút. (3) Tráng lại bằng nước cất và tách hạt đưa vào môi trường nuôi cấy.

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

Môi trường nuôi cấy về thành phần và hàm lượng của các muối khoáng, các vitamin theo môi trường MS [12]. Sử dụng đường saccharose hàm lượng làm nguồn cung cấp cacbon. Chất điều hòa sinh trưởng nhóm gồm BAP và NAA; các chất bổ sung, đường saccharose, nước dừa, dịch chiết, agar và than hoạt tính...

Cách làm dịch chiết: chuối tiêu xanh bỏ vỏ lụa, luộc chín, xay nhỏ mịn riêng từng loại; khoai tây để cả vỏ rửa sạch luộc chín dùng cả nước luộc xay nhỏ mịn. Tất cả các 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 một số yếu tố đến sự tái sinh protocorm

- Thí nghiệm 2.1: Nghiên cứu ảnh hưởng của BAP lên sự tái sinh chồi từ protocorm. Môi trường nuôi cấy gồm các thành phần cơ bản, bổ sung BAP với nồng độ thay đổi ở 4 công thức 0 - 0,5 - 1 - 1,5 mg/l.

- Thí nghiệm 2.2: Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến quá trình nhân nhanh protocorm. Môi trường nuôi cấy bổ sung BAP 1mg/l và saccharose với hàm lượng được thay đổi theo 4 công thức: CT1- 0; CT2- 5g/l; CT3 - 10g/l; CT4 - 15g/l; CT5 - 20g/l.

- Thí nghiệm 2.3: Nghiên cứu ảnh hưởng của nước dừa đến quá trình phát sinh chồi protocorm. Các cụm protocorm cấy trên môi trường MS có chứa BAP 1 mg/l và nước dừa với hàm lượng thay đổi theo từng công thức (CT) như sau: CT1- 0; CT2- 50ml/l; CT3- 100ml/l; CT4- 150 ml/l.

Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến sự nhân nhanh và tái tạo cây hoàn chỉnh lan Thạch học Đùi gà

- Thí nghiệm 3.1: Nghiên cứu ảnh hưởng của BAP đến sự nhân nhanh chồi lan. Các cụm chồi nhỏ phát sinh từ protocorm cấy chuyển vào môi trường MS cơ bản bổ sung nước dừa 50ml/l; than hoạt tính 1g/l và BAP với nồng độ thay đổi ở bốn công thức (CT) thí nghiệm:

CT1- 0; CT2- 0,5mg/l; CT3- 1mg/l; CT4- 1,5mg/l.

- Thí nghiệm 3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng khoai tây và chuối xanh nghiền đến sự phát triển lan. Các cụm lan có kích thước trung bình 3 chồi/ cụm được cấy lên MS bổ sung 1 g/l than hoạt tính; 1 g/l BAP và bổ sung chuối xanh nghiền, khoai tây nghiền với hàm lượng ở các công thức thí nghiệm như sau: CT1- 0, CT2- 30g/l khoai tây, CT3- 50g/l khoai tây, CT4- 30g/l chuối xanh, CT5- 50g/l chuối xanh.

- Thí nghiệm 3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của α - NAA đến khả năng ra rễ. Sử dụng 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 nồng độ thay đổi từ 0 - 0,25 - 0,5 - 0,75 mg/l.

2.2.3. Phương pháp ra cây ngoài vườn ươm

Khi cây con nuôi cấy đã đạt đủ tiêu chuẩn, tiến hành dùng panh gấp cây con khỏi bình nuôi cấy sau đó rửa nhẹ nhàng dưới vòi nước cho thật sạch, để cây con ráo nước sau đó trồng vào cốc nhựa đựng giá thể. Giá thể sử dụng để ra cây gồm mùn cưa đã được ủ hoai mục và vụn dớn.

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 bằng phần mềm phân tích thống kê.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Kết quả khử trùng tạo mẫu sạch bệnh

Tiến hành khử trùng lan Thạch học Đùi gà theo các bước như trình bày ở mục 2.2.1. Kết quả cho thấy, sử dụng mẫu thân để tạo vật liệu ban đầu đưa vào nuôi cấy cho hiệu quả khá thấp. Trong đó sử dụng HgCl₂ 0,1% khử trùng với khoảng thời gian 8 phút cho kết quả tốt nhất nhưng tỉ lệ mẫu sống cũng chỉ đạt 15%. Do đó, chúng tôi tiếp tục tiến hành khử trùng quả lan để gieo hạt tạo vật liệu ban đầu. Qua theo dõi chúng tôi nhận thấy rằng sử dụng HgCl₂ 0,1% khử trùng quả lan 2 lần (8 phút và 5 phút) cho hiệu quả cao, tỉ lệ mẫu nhiễm ít, 100% mẫu không nhiễm đều phát sinh thể chồi (protocorm) sau 5 tuần nuôi cấy.

3.2. Kết quả tái sinh protocorm

3.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ BAP, saccharose đến khả năng tăng sinh protocorm

Sau khi gieo hạt lan khoảng 60 ngày, protocorm xuất hiện dày đặc và bắt đầu tăng sinh, tiến hành tách các khối protocorm và cấy lên môi trường MS bổ sung BAP, saccharose với nồng độ thay đổi (mục 2.2.2). Sau 30 ngày theo dõi, chúng tôi nhận thấy ở tất cả các công thức thí nghiệm, các khối protocorm đều tăng sinh về kích thước. Đối với môi trường bổ sung BAP, ở công thức thí nghiệm 3 (CT3 - bổ sung BAP nồng độ 1mg/l) cho kết quả tăng sinh khối protocorm lớn hơn (hệ số nhân protocorm đạt 3,8 lần) so với các công thức còn lại. Đối với thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của saccharose lên sự phát triển của protocorm nhận thấy, sau 8 tuần theo dõi, ở CT3 (bổ sung BAP 1 mg/l và saccharose 10 g/l) các chỉ tiêu nhân nhanh protocorm vượt trội so với các công thức thí nghiệm khác (đường kính trung bình khối protocorm đạt 10,5/5,0, hệ số nhân protocorm đạt 2,9 lần sau 30 ngày và protocorm có xu hướng biệt hóa hình thành chồi nhanh hơn) (Bảng 1).

3.2.2. Ảnh hưởng của nước dừa đến quá trình phát sinh chồi protocorm

Các cụm protocorm được cấy trên môi trường MS có chứa saccharose 10 g/l; than hoạt tính 1 g/l; BAP 1 mg/l và nước dừa 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 70%) nhưng số lượng chồi/cụm protocorm thấp (trung bình 3 - 5 chồi/cụm). Công thức môi trường CT3 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 97,4% (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). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu về vi nhân giống lan *Dendrobium*. Jaime và cs (2015) khi tổng hợp các công trình nghiên cứu về vi nhân giống *Dendrobium* cho thấy nước dừa thường được thêm vào với nồng độ từ 10 - 25% v/v (chiếm 27,6% các nghiên cứu về vi nhân giống *Dendrobium*) [7]. Tác dụng tích cực của nước dừa đối với vi nhân giống *Dendrobium* được giải thích rằng trong nước dừa có chứa nhiều vitamin, amino acid, đường, khoáng chất và đặc biệt là các phytohormone tự nhiên [13].

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

3.3.1. Ảnh hưởng của BAP đến sự tái sinh chồi lan Thạch học Đùi gà in vitro

Tách các cụm chồi nhỏ phát sinh từ protocorm cấy chuyển vào môi trường MS bổ sung BAP với nồng độ thay đổi (mục 2.2.2), kết quả thu được trình bày ở bảng 3. Kết quả ở bảng 3 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 BAP. Trên môi trường không bổ sung BAP, các cụm chồi chỉ đạt 7,72 chồi/cụm với chiều cao trung bình là 11,5 mm, số lá trung bình là 2,9 và chồi yếu với các biểu hiện hình thái như chồi nhỏ, gầy, lá xanh nhạt. Khi bổ sung BAP vào môi trường, các chỉ tiêu theo dõi tăng theo tương ứng với hàm lượng BAP và cao nhất ở CT4 (bổ sung BAP 1,5 mg/l) với hệ số nhân chồi cao nhất (đạt 9,75 chồi/cụm).

Bảng 1. Ảnh hưởng của BAP, saccharose lên khả năng tái sinh protocorm

	Công thức	Đường kính trung bình khối protocorm ban đầu (mm)	Đường kính trung bình khối protocorm sau 30 ngày (mm)	Hệ số nhân protocorm (lần)
BAP	CT1	5,0 ± 0,15	12 ± 0,10	2,4
	CT2	4,7 ± 0,09	18 ± 0,14	3,6
	CT3	5,2 ± 0,12	20 ± 0,08	3,8
	CT4	5,0 ± 0,15	15 ± 0,18	3,0
Saccharose	CT1	5,2 ± 0,12	8,10 ± 0,45	1,56
	CT2	4,5 ± 0,07	10,5 ± 0,13	2,33
	CT3	5,0 ± 0,08	14,5 ± 0,09	2,90
	CT4	4,7 ± 0,06	13,0 ± 0,10	2,76
	CT5	4,8 ± 0,06	12,0 ± 0,15	2,50

Bảng 2. Ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến khả năng phát sinh chồi từ cụm protocorm

Công thức nhân chồi	Hàm lượng nước dừa (ml/l)	Số cụm protocorm đưa vào	Số cụm protocorm phát sinh chồi	Tỷ lệ phát sinh chồi (%)
CT1	0	40	30	75,0
CT2	50	35	31	88,6
CT3	100	38	37	97,4
CT4	150	33	29	87,9

Bảng 3. Ảnh hưởng của BAP đến sự phát triển cụm chồi lan Thạch học

Môi trường	Nồng độ BAP (mg/l)	Số chồi/cụm	Chiều cao chồi (mm)	Số lá/chồi	Hình thái chồi
CT1	0	7,22 ± 0,07	11,50 ± 0,08	2,90 ± 0,05	Chồi nhỏ, lá xanh nhạt
CT2	0,5	7,85 ± 0,12	14,70 ± 0,10	3,82 ± 0,20	Chồi nhỏ, lá xanh
CT3	1,0	8,32 ± 0,09	16,50 ± 0,12	3,70 ± 0,16	Chồi BT, lá xanh đậm
CT4	1,5	9,75 ± 0,23	17,25 ± 0,20	4,10 ± 0,15	Chồi to, lá xanh đậm

Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (PGR) được sử dụng phổ biến nhất trong vi nhân giống *Dendrobium* 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 cs (2013) đã chỉ ra 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 + 0,5 mg/l BA + 0,1 mg/l NAA + 100 ml/l nước dừa, và MS + 0,25 mg/l BA + 0,1 mg/l NAA + 100 ml/l nước dừa cho nuôi cấy *D. heterocarpum* [14].

3.3.2. Ảnh hưởng của khoai tây và chuối xanh đến sự phát triển chồi lan Thạch học Đùi gà in vitro

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 Thạch học Đùi gà 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 90 ngày được trình bày ở bảng 4. Kết quả cho thấy, ở CT1 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 đạt 4,6 chồi/cụm, chiều cao trung bình đạt 47,1 mm và số lá/chồi là 3,37, chồi nhỏ và lá xanh nhạt). Với môi trường bổ sung hàm lượng khoai tây 30 g/l, thì hệ số nhân chồi đạt 5,8 chồi/cụm, chiều cao trung bình đạt 59,5 mm và số lá/chồi là 4,5; khi tăng hàm lượng khoai tây lên 50 g/l (CT3) thì sự sinh trưởng và phát triển của chồi tăng lên rõ rệt (hệ số nhân chồi đạt 6,3 chồi/cụm, chiều cao trung bình đạt 63,6 mm và số lá/chồi là 5,1). Tương tự với môi trường bổ sung chuối xanh, khi bổ sung 30g/l (CT4), thì hệ số nhân chồi đạt 6,2 chồi/cụm, chiều cao trung bình đạt 54,2 mm và số lá/chồi là 4,1 còn khi tăng hàm lượng chuối xanh lên 50g/l (CT5) thì hệ số nhân chồi đạt 6,8 chồi/cụm, chiều cao trung bình đạt 57,2 mm và số lá/chồi là 4,7.

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 dịch chiết. Jaime và cs [7] 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. 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 [15]. Ngoài các dịch chiết, than hoạt tính cũng thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy phong lan. Than hoạt tính có tác dụng cải thiện sự thông khí và đồng thời thiết lập sự phân cực đối với các nguyên tố vi lượng được thêm vào môi trường đảm bảo nhiệt độ chất nền, hoặc hấp thụ các chất độc hại, bao gồm cả phenol [16], [17]. Trong nghiên cứu này, khi bổ sung 50g/l khoai tây nghiền vào môi trường cho thấy số chồi/cụm nhiều nhất (6,8 chồi/cụm), chiều cao chồi đạt 57,2 mm/chồi và chồi có màu xanh đậm. Như vậy, có thể nhận xét rằng môi trường thích hợp cho nhân chồi lan Thạch học Đùi gà là MS bổ sung đường saccharose 25g/l; agar 6g/l; than hoạt tính 1g/l; BAP 1g/l và khoai tây 50g/l.

3.3.3. Ảnh hưởng của α - NAA đến khả năng ra rễ lan Thạch học Đùi gà *in vitro*

α - NAA là hormone sinh trưởng thuộc nhóm auxin, vai trò của α - NAA là thúc đẩy sự sinh trưởng và dẫn nỡ 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 chạy từ 0 mg/l 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 Thạch học Đùi gà *in vitro*. Ở môi trường CT1 tỷ lệ rễ/cây thấp chỉ đạt trung bình 5,7 rễ/cây; độ dài rễ là 11 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 0,25 mg/l thì số rễ/cây là 6,5; độ dài rễ là 15,9 mm; rễ nhỏ, màu xanh. Khi tăng nồng độ NAA lên 0,5 mg/l thì độ dài rễ lên đến 20,5 mm, và số rễ trên trung bình trên một cây đạt 7,32, rễ mập, dài, màu trắng đục, chóp rễ màu xanh. Chúng tôi tiếp tục tăng nồng độ NAA lên 0,75 mg/l thì số rễ trên cây, chiều dài rễ tương ứng là 6,78 và 18,2 mm. Rễ dài, nhỏ, màu trắng và chóp rễ xanh (Hình 2F). Từ những kết quả trên, chúng tôi đánh giá nồng độ α - NAA 0,5 mg/l là thích hợp cho sự ra rễ của lan Thạch học Đùi gà *in vitro*.

Bảng 4. Ảnh hưởng của chuối xanh và khoai tây nghiền đến sự phát triển lan Thạch học Đùi gà

CT thí nghiệm	Số chồi/cụm cây	Chiều cao tb cây (mm)	Số lá/cây	Hình thái cây
CT1- không bổ sung	4,6 ± 0,06	47,1 ± 2,26	3,3 ± 0,07	Cây nhỏ, lá nhỏ và xanh
CT2 - 30 g/l khoai tây	5,8 ± 0,12	59,5 ± 2,20	4,5 ± 0,11	Cây vừa, lá trung bình và xanh
CT3 - 50 g/l khoai tây	6,3 ± 0,01	63,6 ± 1,82	5,1 ± 0,08	Cây mập, lá to và xanh đậm
CT4 - 30 g/l chuối xanh	6,2 ± 0,04	54,2 ± 3,04	4,1 ± 0,13	Cây nhỏ, lá nhỏ và xanh
CT5 - 50 g/l chuối xanh	6,8 ± 0,06	57,2 ± 3,32	4,7 ± 0,09	Cây nhỏ, lá nhỏ, dài và xanh đậm

Bảng 5. Ảnh hưởng của α - NAA đến khả năng tạo rễ của lan Thạch học

CT	Nồng độ α - NAA	Số rễ tb/cây	Độ dài tb rễ (mm)	Đặc điểm rễ
CT1	0	5,7 ± 0,01	11,0 ± 0,22	Rễ nhỏ, ngắn, màu xanh
CT2	0,25	6,5 ± 0,05	15,9 ± 0,31	Rễ nhỏ, màu xanh,
CT3	0,50	7,3 ± 0,11	20,5 ± 0,25	Rễ mập, dài, màu trắng đục, chóp rễ xanh
CT4	0,75	6,8 ± 0,03	18,2 ± 0,38	Rễ dài, nhỏ, màu trắng đục, chóp rễ có màu xanh

Bảng 6. Ảnh hưởng của một số loại giá thể đến sự phát triển lan Thạch học Đùi gà *in vitro* giai đoạn vườn ươm

Giá thể	Số cây còn sống	Số chồi mới hình thành	Số lá/ cây	Đặc điểm cây
Mùn cưa	42	$1,54 \pm 0,12$	$7,45 \pm 0,12$	Cây khô, lá xanh nhạt và nhỏ, rễ mới hình thành không nhiều, chồi con ít.
Mùn cưa và vụn dớn	46	$2,86 \pm 0,15$	$8,50 \pm 0,03$	Cây to khỏe, lá xanh, ra rễ mới nhiều, rễ xanh, nảy chồi con nhiều.
Vụn dớn	45	$1,70 \pm 0,10$	$6,80 \pm 0,04$	Cây khỏe, lá xanh nhạt, ra rễ mới và nảy chồi con nhưng chưa nhiều.



Hình 2. Nhân giống *in vitro* lan Hoàng Thảo Thạch học Đùi gà. A. protocorm phát sinh từ hạt; B. protocorm trên môi trường nhân nhanh; C. Chồi phát sinh từ protocorm; D. Chồi sinh trưởng trên môi trường tái sinh; E. Cây con trên môi trường bổ sung khoai tây nghiền; F. Cây con ra chai; G. Cây con trên các loại giá thể khác nhau

3.4. Kết quả đưa cây ra vườn ươm

Đưa cây ra ngoài vườn ươm là giai đoạn quan trọng nhằm huấn luyện cây thích nghi với thay đổi của nhiệt độ, độ ẩm, sự mất nước, sâu bệnh và chuyển từ trạng thái dị dưỡng sang tự dưỡng hoàn toàn. 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. Khảo sát ba loại giá thể gồm mùn cưa, hỗn hợp mùn cưa với vụn dớn (tỷ lệ 1:1) và vụn dớn. Mỗi loại giá thể tiến hành trồng 50

cây con. Các bầu cây được đưa vào túi nilon kính và ghim lại nhằm giữ ẩm cục bộ, chăm sóc bằng tưới nước và dung dịch $\frac{1}{2}$ MS. Kết quả theo dõi sau 60 ngày được trình bày trong bảng 6. Kết quả theo dõi sinh trưởng của cây con nhận thấy, 3 loại giá thể sử dụng đều thích hợp với lan Thạch học Đùi gà *in vitro*, tỷ lệ cây sống đều đạt trên 80%. Tuy nhiên giá thể chứa hỗn hợp mùn cưa và vụn dớn đạt chất lượng tốt hơn, tỷ lệ cây sống tới 92%, cây to khỏe ra rễ nhiều, số chồi mới hình thành đạt 2,86 chồi/cây sau 2 tháng (Hình 2G).

Như vậy, có thể kết luận giá thể hỗn hợp mùn cưa và vụn dớn (lệ 1:1) là thích hợp cho sinh trưởng và phát triển của cây lan Thạch học Đùi gà *in vitro* giai đoạn vườn ươm.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường MS bổ sung saccharose 10g/l; than hoạt tính 1g/l; BAP 1 mg/l và nước dừa 100 ml/l thích hợp cho sự tái sinh protocorm. Môi trường thích hợp cho sinh trưởng và phát triển chồi là MS bổ sung đường saccharose 25 g/l; than hoạt tính 1 g/l; BAP 1 mg/l và khoai tây 50 g/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. Cây con *in vitro* trồng trên giá thể hỗn hợp mùn cưa hoai mục và vụn dớn tỉ lệ 1:1 cho kết quả tốt nhất (tỷ lệ cây sống đạt 92%; cây to khỏe ra rễ nhiều, số chồi mới hình thành đạt 2,86 chồi/cây sau 2 tháng).

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 Research International*, vol. 2013, 2013, Art. no.765894, doi: <https://doi.org/10.1155/2013/765894>.
- [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. Dobranszki, 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 lituiflorum* 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]. J. W. H. Yong, L. Ge, Y. F. Ng, and S. N. Tan, “The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water,” *Molecules*, vol. 14, pp. 5144-5164, 2009.
- [14]. Y. Li, D. H. Zhu, H. T. Pan, and Q. X. Zhang, “*In vitro* propagation of three *Dendrobium* species from stems,” *Journal of Northeast Forestry University* vol. 41, pp.77-81, 2013.
- [15]. 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.
- [16]. S. J. Zeng, W. C. Huang, K. L. Wu, J. X. Zhang, J. A. Teixeira da Silva, and J. Duan, “*In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchids,” *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 36, pp. 521-534, 2016.
- [17]. S. J. Zeng, Y. Zhang, J. A. Teixeira da Silva, K. L. Wu, J. X. Zhang, and J. Duan, “Seed biology and *in vitro* seed germination of *Cypripedium*,” *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 34, pp. 358-371, 2014