

## NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* LAN HOÀNG THẢO KÈN (*DENDROBIUM LITUIFLORUM*)

Nguyễn Đức Tuấn<sup>1</sup>, Huỳnh Phước Lễ<sup>1</sup>, Phạm Thị Diễm Thi<sup>2</sup>,  
Trương Thị Bích Phượng<sup>1</sup>, Ngô Thị Minh Thu<sup>1</sup>, Trương Kiều Ngân<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

<sup>2</sup> Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế

<sup>3</sup> Trường Đại học Ngoại ngữ, Đại học Huế

Hoàng thảo kèn (*Dendrobiumlituiflorum* Lindl.), là một trong những loài lan tuyệt đẹp và quý hiếm, rất sai hoa, nở nhiều hoa to 6 - 7 cm, mọc từng chùm 2 - 3 chiếc trên một mắt ở các đốt giữa thân đến ngọn, phát sinh từ thân cây trụi lá cũ. Cây nở hoa từ cuối mùa đông đến mùa xuân, rất thơm, lâu tàn và có giá trị kinh tế rất cao (Trần Hợp, 1998).

Hiện nay, ngoài tự nhiên rất khó tìm thấy do loài hoa này bị săn lùng quá nhiều vì vẻ đẹp của chúng. Ở một số nơi trên thế giới loài hoa này được đưa vào diện được bảo vệ nghiêm ngặt. Nước ta loài Hoàng thảo kèn phân bố chủ yếu ở khu vực Lai Châu, Sơn La và nếu không có biện pháp bảo vệ kịp thời có thể lâm vào nguy cơ tuyệt chủng ngoài tự nhiên. Ngoài ra, việc nhân giống Hoàng thảo kèn bằng phương pháp truyền thống cho hiệu quả không cao, chất lượng cây giống không đảm bảo. Vì vậy, không đáp ứng đủ nhu cầu cho người tiêu dùng trong nước cũng như xuất khẩu.

Việc ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* vào quá trình nhân giống cây lan là vấn đề đang được quan tâm và nghiên cứu (Nguyễn Hoàng Lộc, 2011). Kỹ thuật này không những giải quyết được những vấn đề khó khăn đang gặp phải trong việc bảo tồn và nhân giống lan Hoàng thảo kèn mà còn giúp chủ động sản xuất một số lượng lớn cây giống có chất lượng cao, đồng đều và sạch bệnh.

Trong bài báo chúng tôi trình bày kết quả về nhân giống *in vitro* Hoàng thảo kèn, góp phần bảo tồn tài nguyên di truyền thực vật và làm cơ sở cho việc nhân nhanh loài lan quý này, cung cấp nguồn cây giống chất lượng cao cho nhu cầu trong nước cũng như xuất khẩu.

### I. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Nguyên liệu

Nguyên liệu nuôi cấy ban đầu là quả lan Hoàng thảo kèn thu từ vùng rừng Sìn Hồ, Lai Châu.

#### 2. Phương pháp nghiên cứu.

##### *Vô trùng mẫu cấy*

Quả lan được khử trùng bằng dung dịch HgCl<sub>2</sub> 0,5% trong khoảng 5 - 8 phút. Tiếp theo, quả được rửa lại bằng nước cất vô trùng 5 lần. Sau đó, dùng dao mổ quả để lấy hạt lan bên trong, cấy lên môi trường thích hợp.

Tiến hành theo dõi tỉ lệ nhiễm, tỉ lệ chết của mẫu thí nghiệm sau 1 tuần nuôi cấy.

##### *Môi trường nuôi cấy*

Môi trường nuôi cấy được sử dụng trong các thí nghiệm của chúng tôi là môi trường cơ bản MS (Murashige và Skoog, 1962) có 30 g/l saccharose, 8 g/l agar và bổ sung các tổ hợp chất kích thích sinh trưởng (KTST) với nồng độ thăm dò khác nhau, tùy vào mục đích của từng loại thí nghiệm. Môi trường nuôi cấy có pH = 5,8, được khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm, trong 15 phút.

### **Nuôi cấy ban đầu**

Mẫu đã được khử trùng được cấy lên môi trường MS có 8 g/l agar, 30 g/l saccharose và bổ sung riêng lẻ chất kích thích sinh trưởng BAP ở các nồng độ từ 0,5 mg/l đến 2,0 mg/l.

Đánh giá khả năng nảy mầm và phát triển protocorm sau 6 tuần nuôi cấy.

### **Nhân nhanh protocorm**

Các protocorm phát sinh từ hạt thu được từ giai đoạn nuôi cấy khởi đầu, được cấy chuyển với khối lượng 3 g/bình trên môi trường MS có 8 g/l agar, 30 g/l saccharose và bổ sung riêng lẻ các chất kích thích sinh trưởng BAP (0,5 - 4,0 mg/l), KIN (0,5 - 2,0 mg/l) và NAA (0,5 - 1,5 mg/l) để thăm dò khả năng hình thành và phát triển của protocorm.

Tiếp theo, bổ sung kết hợp vào môi trường nuôi cấy BAP nồng độ 0,5 mg/l và NAA ở các nồng độ khác nhau từ 0,1 mg/l đến 0,4 mg/l để thăm dò khả năng nhân nhanh protocorm.

Nuôi cấy protocorm trong môi trường lỏng, sử dụng bình tam giác loại 250 ml với thể tích môi trường là 50 ml để khảo sát khả năng nhân nhanh trong môi trường nuôi cấy lắc ở tốc độ 100 vòng/phút. Số liệu nghiên cứu được thu sau 4 – 7 tuần nuôi cấy bằng phương pháp cân định lượng khối lượng mẫu trong bình nuôi hàng tuần.

### **Nhân nhanh chồi**

Các chồi thu được từ giai đoạn nuôi cấy khởi đầu. Được cấy trên môi trường dinh dưỡng cơ bản MS có 8 g/l agar, 30 g/l saccharose và bổ sung riêng lẻ các chất kích thích sinh trưởng BAP, KIN ở các nồng độ khác nhau từ 0,5 - 2,0 mg/l để thăm dò khả năng tạo cụm chồi.

Số liệu nghiên cứu được thu sau 6 tuần nuôi cấy gồm: số chồi, chiều cao chồi, số lá.

### **Tạo rễ**

Các chồi từ 3 – 5 cm thu được từ các thí nghiệm trên được tách riêng rẽ và cấy trên môi trường cơ bản MS có 8 g/l agar, 30 g/l saccharose và bổ sung riêng lẻ NAA từ 0,2 mg/l đến 0,8 mg/l, IBA được bổ sung ở các nồng độ từ 0,3 mg/l đến 1,2 mg/l để thăm dò khả năng hình thành và phát triển của rễ từ chồi *in vitro*.

Theo dõi các chi tiêu: số rễ, độ dài rễ sau 6 tuần nuôi cấy.

### **Đưa cây ra vườn ươm**

Các loại giá thể sử dụng gồm: dớn trắng, xơ dừa, rêu. Tất cả các loại giá thể được ngâm dung dịch thuốc diệt nấm và để ráo. Cây con có từ 3 rễ trở lên, độ dài rễ khoảng 2 cm được ngâm với thuốc diệt nấm trong 10 phút sau đó trồng lên các loại giá thể khác nhau, theo dõi tỉ lệ sống của cây sau 4 tuần.

### **Phân tích số liệu**

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp quan sát ít nhất 10 mẫu. Kết quả thí nghiệm được xử lý để thu giá trị trung bình và phân tích Duncan's test bằng phần mềm SPSS 16.0 với mức xác suất có ý nghĩa  $p < 0,05$ .

## **II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN**

### **Vô trùng mẫu cấy**

Thời gian khử trùng quả lan bằng  $HgCl_2$  0,5% thích hợp nhất là 7 phút, tỷ lệ mẫu sống không bị nhiễm cao nhất đạt 83,72% với tỷ lệ mẫu nhiễm là 9,3% và tỷ lệ mẫu chết là 6,98%.

### Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nảy mầm của hạt lan

Hạt lan được cấy trải mỏng, đều lên bề mặt môi trường cơ bản MS bổ sung BAP ở nồng độ khác nhau từ 0,5 - 2,0 mg/l để thăm dò ảnh hưởng của BAP lên tỷ lệ nảy mầm và khả năng phát triển của hạt lan trong giai đoạn đầu. Kết quả khảo sát được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1

#### Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nảy mầm *in vitro*

Nồng độ BAP (mg/l)	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Khả năng phát triển Protocorm	Khả năng tạo chồi
0,0	75,86	++	++
0,2	82,87	++++	++
<b>0,5</b>	<b>92,15</b>	++++	++
0,8	87,03	+++	+++
1	80,84	++	+++

+ : Phát sinh PLB yếu ++ : Phát sinh PLB trung bình

+++ : Phát sinh PLB mạnh ++++ : Phát sinh PLB rất mạnh

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, nồng độ BAP có ảnh hưởng tới tỷ lệ nảy mầm, khả năng phát triển protocorm và khả năng tạo chồi của hạt lan. Trên môi trường không bổ sung chất kích thích sinh trưởng, hạt nảy mầm với tỷ lệ 75,86%, thấp hơn các môi trường có bổ sung BAP. Tỷ lệ hạt nảy mầm cao nhất đạt 92,15% ở nồng độ BAP 0,5 mg/l đồng thời khả năng phát triển protocorm rất mạnh. Khi tăng nồng độ BAP từ 0,8-1 mg/l, tỷ lệ nảy mầm giảm dần (tương ứng là 87,03% và 80,84%), khả năng phát triển protocorm giảm dần và khả năng tạo chồi tăng.

#### Khả năng nhân nhanh protocorm

Ở tất cả các lô thí nghiệm, trong 6 tuần đầu kể từ khi protocorm được cấy lên môi trường, khối lượng protocorm tăng lên đáng kể. Tuy nhiên, ở tuần thứ 7, khối lượng protocorm không có sự thay đổi nhiều so với tuần thứ 6, một số protocorm có dấu hiệu mất diệp lục và chết. Do đó, hệ số nhân protocorm sẽ được tính dựa trên khối lượng protocorm thu được ở tuần thứ 6.

#### Ảnh hưởng của BAP và KIN đến khả năng nhân nhanh protocorm

Để nghiên cứu ảnh hưởng của BAP lên khả năng nhân nhanh protocorm, chúng tôi tiến hành cấy chuyển protocorm thu từ nuôi cấy hạt lên môi trường có nồng độ BAP thay đổi từ 0,5 – 4,0 mg/l, KIN 0,5-2mg/l với khối lượng protocorm ban đầu là 3 g/bình. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân nhanh protocorm sau 7 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 2.

Kết quả khảo sát thời gian nuôi cấy cho thấy, sinh khối protocorm tăng từ tuần thứ 4 tới tuần thứ 6. Ở tuần thứ 7, quá trình tăng sinh diễn ra chậm hơn và một số môi trường còn lại có sự giảm khối lượng protocorm do xuất hiện sự mất diệp lục và chết của một số protocorm. Do vậy, chúng tôi kết luận thời gian 6 tuần là thích hợp cho việc nhân nhanh protocorm trong môi trường MS bổ sung chất kích thích sinh trưởng BAP và sử dụng khối lượng protocorm đo được ở tuần thứ 6 để tính hệ số nhân.

Bảng 2

**Ảnh hưởng của BAP và KIN đến khả năng nhân nhanh protocorm**

BAP (mg/l)	KIN mg/l	Khối lượng protocorm (g)				Hệ số nhân (lần)
		4 tuần	5 tuần	6 tuần	7 tuần	
0,0	0	4,55 <sup>c</sup>	5,10 <sup>cd</sup>	6,20 <sup>d</sup>	6,00 <sup>d</sup>	2,01 <sup>cd</sup>
<b>0,5</b>	<b>0</b>	<b>9,65<sup>a</sup></b>	<b>14,67<sup>a</sup></b>	<b>22,50<sup>a</sup></b>	<b>22,8<sup>a</sup></b>	<b>7,50<sup>a</sup></b>
1,0	0	6,91 <sup>b</sup>	10,54 <sup>b</sup>	13,80 <sup>b</sup>	14,03 <sup>b</sup>	4,60 <sup>b</sup>
2,0	0	4,56 <sup>d</sup>	5,73 <sup>c</sup>	7,89 <sup>c</sup>	7,75 <sup>c</sup>	2,63 <sup>c</sup>
3,0	0	3,53 <sup>d</sup>	4,04 <sup>de</sup>	4,32 <sup>e</sup>	4,23 <sup>e</sup>	1,44 <sup>de</sup>
4,0	0	3,43 <sup>d</sup>	3,50 <sup>e</sup>	3,52 <sup>e</sup>	3,39 <sup>e</sup>	1,14 <sup>e</sup>
0	0,5	5,23 <sup>ab</sup>	7,83 <sup>b</sup>	15,87 <sup>ab</sup>	17,30 <sup>ab</sup>	5,29 <sup>ab</sup>
0	<b>1,0</b>	<b>6,07<sup>a</sup></b>	<b>11,73<sup>a</sup></b>	<b>18,65<sup>a</sup></b>	<b>19,30<sup>a</sup></b>	<b>6,22<sup>a</sup></b>
0	1,5	5,39 <sup>ab</sup>	9,05 <sup>b</sup>	14,79 <sup>bc</sup>	15,17 <sup>bc</sup>	4,93 <sup>bc</sup>
0	2,0	4,69 <sup>b</sup>	8,61 <sup>b</sup>	12,85 <sup>c</sup>	13,85 <sup>c</sup>	4,28 <sup>c</sup>

**Chú thích:** từ bảng 2 – 6; trên cùng một cột, các giá trị không mang chữ cái giống nhau có sự sai khác có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  (Duncan's test).

Từ kết quả thu được ở bảng 2 cho thấy, môi trường bổ sung 0,5 mg/l BAP là thích hợp nhất cho việc nhân nhanh protocorm với hệ số nhân đạt 7,50 lần, cao hơn kết quả tốt nhất ở môi trường bổ sung KIN 1mg/l đạt hệ số nhân là 6,22. Khi tăng dần nồng độ BAP và KIN trong môi trường nuôi cấy thì hiệu quả nhân nhanh sẽ giảm dần ở cả hai môi trường.

**Ảnh hưởng kết hợp của BAP và NAA đến khả năng nhân nhanh protocorm**

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tổ hợp BAP 0,5 mg/l và NAA đến khả năng nhân nhanh protocorm được trình bày ở bảng 3.

Từ bảng 3 ta thấy, kết quả nhân protocorm đạt cao nhất ở nồng độ NAA 0,3 mg/l kết hợp với BAP 0,5 mg/l, sinh khối thu được là 29,25 g sau 6 tuần nuôi cấy, tương ứng với hệ số nhân là 9,75 lần. Sau đó, hệ số nhân giảm khi tiếp tục tăng nồng độ NAA, ở nồng độ NAA 0,4 mg/l thì hệ số nhân giảm từ 9,75 lần xuống còn 7,37 lần.

Như vậy, môi trường MS bổ sung kết hợp 0,5 mg/l BAP và 0,3 mg/l NAA cho hiệu quả cao nhất khi kết hợp BAP (0,5 mg/l) và NAA (0,1 – 0,4 mg/l). Ngoài ra, hệ số nhân protocorm thu được ở công thức trên (9,75 lần) cao hơn các ở môi trường bổ sung riêng lẻ BAP (7,50 lần), KIN (6,22 lần).

Bảng 3

**Ảnh hưởng kết hợp của 0,5 mg/l BAP và NAA đến khả năng nhân nhanh protocorm**

Nồng độ NAA (mg/l)	Khối lượng protocorm (g)				Hệ số nhân (lần)
	4 tuần	5 tuần	6 tuần	7 tuần	
0,0	9,65 <sup>ab</sup>	14,67 <sup>b</sup>	22,30 <sup>c</sup>	23,12 <sup>c</sup>	7,50 <sup>c</sup>
0,1	7,67 <sup>c</sup>	12,10 <sup>b</sup>	24,32 <sup>bc</sup>	25,14 <sup>bc</sup>	8,11 <sup>bc</sup>
0,2	8,71 <sup>bc</sup>	13,69 <sup>b</sup>	25,72 <sup>b</sup>	26,22 <sup>b</sup>	8,57 <sup>b</sup>
<b>0,3</b>	<b>10,78<sup>a</sup></b>	<b>17,98<sup>a</sup></b>	<b>29,25<sup>a</sup></b>	<b>29,80<sup>a</sup></b>	<b>9,75<sup>a</sup></b>
0,4	8,53 <sup>bc</sup>	13,95 <sup>a</sup>	22,11 <sup>c</sup>	22,50 <sup>c</sup>	7,37 <sup>c</sup>

### Ảnh hưởng của nuôi cấy lác lên khả năng nhân nhanh protocorm

Để nghiên cứu ảnh hưởng của lượng mẫu tối ưu dùng để nhân nhanh protocorm bằng phương pháp nuôi cấy lác, chúng tôi tiến hành cấy chuyển protocorm vào các bình tam giác thể tích 250 ml chứa 50 ml môi trường MS bổ sung 0,3 mg/l NAA, 0,5 mg/l BAP, 30 g/l saccharose và thay đổi khối lượng protocorm cấy vào mỗi bình từ 1,0 g/bình đến 3,0 g/bình. Sau đó, tiến hành nuôi cấy lác ở nhiệt độ phòng với tốc độ 100 vòng/phút. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của phương pháp nuôi cấy lác đến khả năng nhân nhanh protocorm được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4

#### Ảnh hưởng của lượng mẫu nuôi cấy lác đến khả năng nhân nhanh protocorm

Lượng mẫu ban đầu (g)	Khối lượng protocorm (g)				Hệ số nhân (lần)
	4 tuần	5 tuần	6 tuần	7 tuần	
1,0	4,95 <sup>c</sup>	7,06 <sup>d</sup>	9,66 <sup>c</sup>	10,92 <sup>c</sup>	9,66 <sup>c</sup>
<b>1,5</b>	<b>9,93<sup>b</sup></b>	<b>18,37<sup>a</sup></b>	<b>26,62<sup>a</sup></b>	<b>27,53<sup>a</sup></b>	<b>17,75<sup>a</sup></b>
2,0	8,05 <sup>b</sup>	12,09 <sup>c</sup>	23,13 <sup>b</sup>	25,28 <sup>b</sup>	12,64 <sup>b</sup>
3,0	13,47 <sup>a</sup>	17,04 <sup>b</sup>	26,18 <sup>a</sup>	28,45 <sup>a</sup>	9,48 <sup>c</sup>

Từ kết quả thu được ở bảng 4 cho thấy, lượng mẫu ban đầu có ảnh hưởng tới khả năng nhân nhanh các protocorm được nuôi cấy lác trên môi trường lỏng.

Với khối lượng mẫu ban đầu bằng với khối lượng mẫu cấy trên môi trường rắn (3 g) thì nuôi cấy lác cho hệ số nhân thấp hơn so với nuôi cấy trên môi trường rắn (9,48 so với 15,27). Tuy nhiên, khi giảm dần lượng mẫu cấy ban đầu thì hệ số nhân tăng dần. Quá trình nhân nhanh protocorm bằng nuôi cấy lác trong các bình tam giác 250 ml đạt hiệu quả cao nhất ở khối lượng 1,5 g với hệ số nhân 17,75 lần. Khi lượng mẫu cấy ban đầu tiếp tục giảm còn 1 g, hiệu quả nhân nhanh protocorm cũng giảm, khối lượng protocorm thu được sau 6 tuần là 9,66 lần.

Kết quả này tốt hơn so với kết quả nuôi cấy lác protocorm lan Vũ nữ của Jang và cs (2010) với hệ số nhân là 4,4 lần với khối lượng mẫu ban đầu là 0,8 g.

#### Nhân chồi *in vitro*

Chồi 1 đến 2 lá mầm thu được từ các thí nghiệm trên được cấy lên môi trường có nồng độ KIN thay đổi từ 0,5 – 2,0 mg/l, BAP nồng độ từ 1-2mg/l. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của KIN, BAP đến khả năng nhân chồi sau 6 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5

#### Ảnh hưởng của KIN, BAP đến khả năng nhân nhanh chồi sau 6 tuần

Nồng độ KIN (mg/l)	Nồng độ BAP (mg/l)	Số chồi (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá (lá/chồi)
0,0	0	4,8 <sup>b</sup>	1,28 <sup>b</sup>	1,24 <sup>b</sup>
0,5	0	5,2 <sup>b</sup>	1,73 <sup>a</sup>	2,52 <sup>a</sup>
<b>1,0</b>	0	<b>6,2<sup>a</sup></b>	<b>1,98<sup>a</sup></b>	<b>3,00<sup>a</sup></b>
1,5	0	5,5 <sup>ab</sup>	1,63 <sup>a</sup>	3,06 <sup>a</sup>
2,0	0	5,0 <sup>b</sup>	1,49 <sup>ab</sup>	3,16 <sup>a</sup>
0	1,0	5,75 <sup>bc</sup>	1,59 <sup>bc</sup>	2,63 <sup>a</sup>
0	<b>1,5</b>	<b>8,50<sup>a</sup></b>	<b>2,18<sup>a</sup></b>	<b>3,27<sup>a</sup></b>
0	2,0	7,60 <sup>ab</sup>	1,71 <sup>b</sup>	3,26 <sup>a</sup>

Kết quả này tốt hơn so với kết quả nhân chồi tốt nhất ở *Dendrobiumfimbriatum* của Nguyễn Thị Sơn và cs (2014) đạt 3,44 chồi/mẫu sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 10% CW, 10 g/l saccharose, 60 g/l chuối chín, 6 g/l than hoạt tính, 6 g/l agar.

### Tạo rễ

Chồi thu được từ các thí nghiệm trên được tách riêng và cấy trên môi trường cơ bản MS bổ sung riêng lẻ IBA nồng độ từ 0,3 – 1,2 mg/l và NAA nồng độ 0,2 – 0,8 mg/l để khảo sát ảnh hưởng của các chất kích thích sinh trưởng đến khả năng hình thành và phát triển rễ từ chồi *in vitro*. Kết quả nghiên cứu được trình bày qua bảng 6.

Từ kết quả ở bảng 6 cho thấy, bổ sung IBA và NAA vào môi trường nuôi cấy để tạo rễ mang lại hiệu quả tích cực hơn so với không bổ sung. Ở môi trường bổ sung IBA (0,3-1,2mg/l) kết quả tốt nhất thu được ở nồng độ 0,6mg/l IBA cho 4,45 rễ/chồi và chiều dài rễ đạt 2,03cm. Ở môi trường bổ sung NAA (0,2-0,8), kết quả tốt nhất cũng thu được ở nồng độ NAA là 0,6 mg/l nhưng hiệu quả ra rễ đạt 5,50 rễ/chồi, chiều dài rễ đạt 2,68cm. Nếu nồng độ IBA và NAA tăng cao thêm thì hiệu quả ra rễ đều giảm ở cả hai loại môi trường.

Như vậy, Hoàng thảo kèn ra rễ tốt nhất ở môi trường bổ sung 0,6mg/l NAA.

Kết quả của chúng tôi tốt hơn so với kết quả của Sanna Asghar và cs (2011) trên đối tượng *Dendrobium nobile* var. Emma tạo rễ trên môi trường MS bổ sung 2 mg/l IBA với số lượng rễ là 4,7 rễ/chồi.

Bảng 6

### Ảnh hưởng của IBA, NAA đến khả năng hình thành và phát triển rễ sau 6 tuần nuôi cấy

IBA (mg/l)	NAA (mg/l)	Số rễ (rễ/chồi)	Chiều dài rễ (cm)
0	0,0	3,00 <sup>c</sup>	1,63 <sup>b</sup>
0	0,2	4,50 <sup>ab</sup>	2,02 <sup>ab</sup>
0	0,4	4,67 <sup>ab</sup>	2,13 <sup>ab</sup>
0	<b>0,6</b>	<b>5,50<sup>a</sup></b>	<b>2,68<sup>a</sup></b>
0	0,8	3,67 <sup>bc</sup>	2,22 <sup>ab</sup>
0,3	0	3,54 <sup>b</sup>	1,65 <sup>b</sup>
<b>0,6</b>	<b>0</b>	<b>4,45<sup>a</sup></b>	<b>2,03<sup>a</sup></b>
0,9	0	4,02 <sup>ab</sup>	1,85 <sup>ab</sup>
1,2	0	3,76 <sup>b</sup>	1,51 <sup>b</sup>

### Đưa cây ra vườn ươm

Để nghiên cứu ảnh hưởng của các loại giá thể khác nhau lên khả năng sống sót của cây *in vitro* khi đưa ra ngoài tự nhiên, chọn những cây con có từ 3 rễ trở lên, độ dài rễ khoảng 2 cm được ngâm với thuốc diệt nấm trong 10 phút sau đó trồng lên các loại giá thể khác nhau, theo dõi tỉ lệ sống của cây sau 4 tuần. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của loại giá thể đến khả năng sống sót của cây *in vitro* chuyển ra ngoài tự nhiên được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7

**Ảnh hưởng của loại giá thể đến khả năng sống sót của cây *in vitro* chuyển ra ngoài tự nhiên**

Giá thể	Tỉ lệ cây sống (%)
<b>Rêu</b>	<b>85%</b>
Dón trắng	75%
Xơ dừa	45%

Từ kết quả ở bảng 7 cho thấy kết quả tốt nhất thu được ở giá thể rêu với tỷ lệ cây sống đạt 85%. Ở giá thể xơ dừa, tỷ lệ cây con sống sót là thấp nhất (45%). Khi thay bằng giá thể dón trắng, tỷ lệ sống được cải thiện rõ rệt (tăng 30%). Cây *in vitro* khi đưa ra ngoài vườn ươm thích hợp nhất với loại giá thể là rêu với tỉ lệ cây sống 84% sau 1 tháng theo dõi.

Kết quả tỷ lệ sống của cây con trồng trên giá thể rêu cao hơn so với cây con trồng trên các giá thể xơ dừa và dón có thể là do rêu có khả năng giữ một độ ẩm vừa phải (không có độ ẩm quá cao như dón trắng và cũng không thấp như giá thể xơ dừa). Ngoài ra, giá thể rêu cũng tạo cho rễ cây lan con các khoảng không vừa phải giữa các sợi rêu tạo ra sự thoáng khí tốt.

Kết quả này là tốt hơn so với kết quả của Nguyễn Thị Tâm và cs (2007) tiến hành trên đối tượng *Dendrobium hybrid* với tỉ lệ cây sống thu được cao nhất là 67,67% trên giá thể rêu .

### III. KẾT LUẬN

Khử trùng quả lan bằng HgCl<sub>2</sub> 0,5% trong thời gian 7 phút có hiệu quả khử trùng tốt nhất với tỉ lệ mẫu sống đạt 83,72%. Môi trường thích hợp nhất cho sự nảy mầm của hạt lan là MS bổ sung 1,0 mg/l BAP với tỉ lệ nảy mầm là 92,15%. Môi trường MS bổ sung kết hợp 0,5 mg/l BAP và 0,3 mg/l NAA, thích hợp nhất cho nhân nhanh protocorm trên môi trường thạch với hệ số nhân đạt 15,27 lần. Nuôi cấy lác trong bình tam giác 250 ml cho hiệu quả nhân protocorm tốt nhất khi lượng mẫu đưa vào cấy ban đầu là 1,5 g với 50 ml môi trường, nuôi lác ở tốc độ 100 vòng/phút hệ số nhân đạt 17,75 lần. Môi trường tối ưu cho nhân nhanh chồi *in vitro* cây lan Hoàng thảo kèn là MS bổ sung 1,5 mg/l BAP với hệ số nhân là 8,5 chồi/mẫu và chiều cao chồi là 1,68 cm. Chồi tạo rễ tốt nhất trên môi trường MS bổ sung 0,6 mg/l NAA với số rễ đạt 5,5 rễ/chồi, chiều dài trung bình rễ là 2,68 cm. Cây lan Hoàng thảo kèn *in vitro* thích hợp đưa ra trồng trên giá thể rêu với tỉ lệ cây sống là 84%. Các kết quả thí nghiệm được thể hiện bằng ảnh chụp trong hình 1.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Asghar S., Ahmad T., Hafiz I.A., and Yaseen M.**, 2011. In vitro propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. *Academic journals*, 10(16): 3097-3103.
2. **Trần Hợp**, 1998. *Phong lan Việt Nam*. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
3. **Nguyễn Hoàng Lộc**, 2011. *Nuôi cấy mô và tế bào thực vật*. Nhà xuất bản Đại học Huế. 303 trang.
4. **Nguyễn Thị Tâm, Vũ Thị Lan và Nguyễn Thành Luân**, 2007. Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường và giá thể đến sinh trưởng của cây lan *Dendrobium hybrid in vitro*. *Tạp chí Khoa học công nghệ*, 3(43): 106 - 110.

5. Nguyễn Thị Sơn, Từ Bích Thủy, Đặng Thị Nhàn, Nguyễn Thị Lý An, Hoàng Thị Nga và Nguyễn Quang Thạch , 2014. Nhân giống *in vitro* lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (Thạch học Thiết bì). *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 12(8): 1274-1282.
6. Yang J. F., Piao X. C., Sun D., and Lian M. L., 2010. Production of protocorm-like bodies with bioreactor and regeneration *in vitro* of *Oncidium* 'Sugar Sweet'. *Scientia Horticulturae*, 125: 712-717.

## STUDY ON MICROPROPAGATION OF *DENDROBIUM LITUIFLORUM*

Nguyen Duc Tuan, Huynh Phuoc Le, Truong Thi Bich Phuong,  
Pham Thi Diem Thi, Ngo Thi Minh Thu, Truong Kieu Ngan

### SUMMARY

*Dendrobium lituiflorum* is very beautiful orchid and rare. In Vietnam, *Dendrobium lituiflorum* can be find in the forest of Lai Chau and Son La provinces. Due to the over exploitation the natural population of this species is being threatened. by The traditional method by propagation of *Dendrobium lituiflorum* was ineffective. So, micropropagation technique was applied to *Dendrobium lituiflorum*. In this study, sterilizing fruit of *Dendrobium lituiflorum* with HgCl<sub>2</sub> 0.5% for 7 minutes was found to increase the survival rate (up to 83,72%). Seeds of *Dendrobium lituiflorum* showed the highest germination on MS medium supplemented with 1 mg/l BAP, rate of germination was 92.15%. MS medium supplemented with 0.5mg/l BAP and 0.3mg/l NAA was optimal for protocorm multiplication on agar medium. Shaking culture in triangular vase 250ml with 1.5mg protocorm and 50ml medium, shaking speed 100 rpm, protocorm multiplier is 17.15. The best medium for *in vitro* shoots multiplication was MS supplemented with 1.5mg/l BAP, 8.5 shoots per cluster, height of shoots was 1.68 cm. Shoots rooting the best on MS medium supplemented 0.6mg/l NAA, with 5.5 roots per shoot, the average length of root was 2.68cm. *Dendrobium lituiflorum*, *in vitro* propagated and planted on moss, has a rate of survival of 84%.





Hình 1: Ảnh minh họa kết quả thí nghiệm

**Chú thích:**

- a. Hạt lan nảy mầm sau 4 tuần nuôi cấy.
- b. Nhân nhanh protocorm trên môi trường MS bổ sung 0,5mg/l BAP.
- c. Nhân nhanh protocorm trên môi trường bổ sung 0,5 mg/l BAP và 0,2 mg/l NAA.
- d. Nhân nhanh protocorm trong môi trường lỏng với lượng mẫu ban đầu là 1,5g.
- e. Nhân nhanh chồi trên môi trường bổ sung 1,5mg/l BAP.
- f. Cây con *in vitro* hoàn chỉnh.
- g. Cây con trồng trên giá thể rêu sau 1 tháng theo dõi.