

NHÂN GIỐNG *IN VITRO* LAN *Dendrobium Officinale* Kimura Et Migo (THẠCH HỘC THIẾT BÌ)

Nguyễn Thị Sơn^{1*}, Từ Bích Thủy², Đặng Thị Nhân¹, Nguyễn Thị Lý Anh¹,
Hoàng Thị Nga¹, Nguyễn Quang Thạch¹

¹*Viện Sinh học Nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam;* ²*Đại học Nguyễn Tất Thành*

Email*: nguyensonbio@gmail.com

Ngày gửi bài: 16.10.2014

Ngày chấp nhận: 24.11.2014

TÓM TẮT

Lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. (Thạch hộc Thiết bì) là giống lan quý được sử dụng làm thuốc và thực phẩm chức năng chữa bệnh tiểu đường và các bệnh nan y đang được thương mại hóa rộng rãi trên thế giới. Kết quả nghiên cứu đã chỉ rõ: Nhân giống bằng gieo hạt trên môi trường VW+ 10g sucrose + 6g agar + 100ml nước dừa (ND)/lít môi trường, nhân nhanh cụm chồi tốt nhất trên môi trường MS + 100ml ND + 20g sucrose + 6g agar + 60g chuối chín/lít môi trường. Nhân giống vô tính thông qua nuôi cấy đoạn thân mang mắt ngủ sử dụng đoạn thân *in vitro* mang 2 mắt ngủ và nuôi cấy trên môi trường MS + 20g sucrose + 10% ND + 0,5 mg/l BA + 0,5mg/l α -NAA + 6g agar/lít môi trường. Môi trường tạo cây hoàn chỉnh là RE + 10g sucrose + 6g agar + 0,3g THT + 0,5 mg/l α -NAA.

Từ khóa: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo., đoạn thân mang mắt ngủ, nhân nhanh, quả lan.

In vitro Micropropagation of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

ABSTRACT

Dendrobium officinale Kimura et Migo. is a precious orchid and has been using as medicinal plant. Moreover, this plant has been used to produce functional foods for treatment of diabetes and difficult-to-cure diseases, which are commercially available world-wide. *In vitro* propagation of *D. officinale* Kimura et Migo was conducted in order to maintain the genetic pool of this precious orchid species. The results showed that the medium for *in vitro* seed germination was VW + 10g sucrose + 6g agar + 100ml coconut milk per liter. The best medium for rapid propagation of shoot cluster was MS + 20g sucrose + 100ml coconut milk + 6g agar + 0.5 mg BA + 60g ripe banana per liter. The most appropriate medium for propagation of *in vitro* nodal stems was MS + 20g sucrose + 100ml coconut milk + 0.5mg/l α -NAA + 6g agar per liter. The rooting medium was RE + 10g sucrose + 6g agar + 0.3g active charcoal + 0.5 mg/l α -NAA per liter.

Keywords: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo., *in vitro* propagation, seed germination, nodal stems.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. (Thạch hộc Thiết bì) có trong tự nhiên với nhiều giá trị được học như chống ung thư, chống lão hóa, tăng sức đề kháng của cơ thể, làm dẫn mạch máu và kháng đông máu, được sử dụng rộng rãi trong lâm sàng, làm các bài thuốc và đặc biệt là chữa bệnh tiểu đường, cao huyết áp (Kowitdamrong, 2013; Chu, 2014). Hiện nay

Dendrobium officinale Kimura et Migo. phân bố rất phân tán và không liên tục do hậu quả của sự tàn phá môi trường sống bởi các hoạt động đốn gỗ và khai thác quá mức của con người đã khiến cho giống lan này tiết chủng, trở thành loài có nguy cơ liệt vào danh sách các loài cần được bảo vệ (Gu, 2007).

Nhiều loài lan quý hiếm bị đe dọa tuyệt chủng trong tự nhiên thường được bảo tồn nhờ phương thức nảy mầm từ hạt (Kauth, 2005). Với

công nghệ nhân giống *in vitro* hiện nay, hệ số nhân giống từ một quả lan là rất lớn, từ vài ngàn đến một triệu cây con (Trần Văn Minh, 2001). Đã có các tác giả trong và ngoài nước nhân giống lan *Dendrobium* sp. bằng phương pháp gieo hạt lan trên nền môi trường MS có bổ sung 0,5mg/l NAA (Luan et al., 2006). Nguyễn Văn Song (2011) cũng nhân nhanh *in vitro* loài lan rừng có nguy cơ tuyệt chủng với nguồn nguyên liệu ban đầu là gieo hạt trên môi trường MS + 15% đường sacarose + 2,0 mg/l BA. Trong 3 năm gần đây Viện Sinh học Nông nghiệp đã thành công khi áp dụng công nghệ nuôi cấy mô nhân giống một số loài lan bản địa làm được liệu thuộc chi Hoàng Thảo có nguy cơ bị tuyệt chủng (Nguyễn Thị Sơn và cs., 2012; 2013; Vũ Ngọc Lan và cs., 2013).

Để chủ động nguồn cây giống có chất lượng cao, sạch bệnh phục vụ cho phát triển sản xuất phục vụ nhu cầu nội tiêu cũng như xuất khẩu thì nhiệm vụ nhân giống lan bằng phương pháp nuôi cấy mô là hướng đi đúng đắn nhằm bổ sung thêm giống lan thuốc, đẩy mạnh phát triển loại lan dược liệu quý hiếm cho Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Nghiên cứu được tiến hành trên giống Thạch học thiết bì (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo.) từ Viện Sinh học Nông nghiệp - Học viện Nông nghiệp Việt Nam nghiên cứu thu thập tại Triết Giang - Trung Quốc. Sử dụng quả và đoạn thân *in vitro* mang mắt ngủ.

2.2. Phương pháp

Các thí nghiệm sử dụng phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật (Gamborg and Phillips, 1995). Môi trường sử dụng trong thí nghiệm là Vacin & Went (1949), Murashige & Shoog (1962), Hyponex (N:P:K = 6,5:6:19), Robert Ernst (1979): 6,2 g/l agar, 10-20 g/l saccarose tùy từng giai đoạn của thí nghiệm và 100 mg/l inositol), có bổ sung các dịch nghiên: Nước dừa (ND), táo, chuối, khoai tây, cà rốt... hoặc chất điều tiết sinh trưởng tùy từng giai đoạn thí nghiệm. Cách làm dịch nghiên: quả táo đỏ, cà rốt để cả vỏ rửa sạch, chuối tiêu chín bỏ vỏ, xay

nhỏ mịn riêng từng loại; khoai tây để cả vỏ rửa sạch luộc chín dùng cả nước luộc xay nhỏ mịn. pH môi trường là 5,8. Môi trường nuôi cấy được hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút ở áp suất 1atm. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên CRD, 3 lần nhắc lại. Mỗi lần nhắc lại 10 mẫu/công thức được đo đếm và quan sát định kỳ 2 tuần/lần.

Nhân giống từ hạt trên 3 loại môi trường Môi trường sử dụng trong thí nghiệm là Vacin & Went (1949), Murashige & Shoog (1962), Hyponex (N:P:K = 6,5:6:19), Robert Ernst (1979) để tạo nguồn vật liệu ban đầu. Xác định môi trường nền nhân nhanh cụm chồi và ảnh hưởng của dịch nghiên củ quả đến khả năng nhân nhanh chồi trên môi trường nền MS. Sử dụng các chồi thu được từ thí nghiệm trên cắt thành các đoạn thân mang 1-2-3-4 mắt ngủ và được đưa vào nuôi cấy trên môi trường nền MS để tìm hiểu ảnh hưởng của số đốt đến sinh trưởng của chồi. Sử dụng đoạn thân mang 2 mắt ngủ bổ sung kết hợp BA với NAA theo tỷ lệ khác nhau nhằm tăng khả năng sinh trưởng chồi. Các chồi thu được ở thí nghiệm trên được sử dụng cấy vào các nền môi trường khác nhau sau đó bổ sung NAA ở các nồng độ khác nhau để tạo cây hoàn chỉnh.

Các chỉ tiêu theo dõi tiến hành theo phương pháp nghiên cứu nông sinh học thông dụng: Tỷ lệ mẫu sống và phát sinh chồi, số lượng chồi trung bình (TB)/bình, số lượng chồi TB/cụm, hệ số nhân chồi, chiều cao chồi TB, số chồi TB, số lá TB, đường kính chồi TB, hình thái chồi, Tỷ lệ chồi tạo rễ, số rễ TB/chồi, chiều dài rễ TB.

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được phân tích phương sai (ANOVA) một nhân tố, phân tích hậu kiểm Fisher's PLSD với mức $P \leq 0,05$ bằng phần mềm Microsoft Excel, IRRISTAT 4.0 và SPSS 11.5

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nhân giống bằng gieo hạt

3.1.1. Khử trùng quả lan

Nhiều công trình nghiên cứu trong nước và thế giới trên đã công bố kết quả nghiên cứu khử

Bảng 1. Kết quả gieo hạt lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo.

CTTN	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu sống có phát sinh chồi (%)		Màu sắc mẫu sau 8 tuần	Chất lượng mẫu sau 8 tuần
		4 tuần	6 tuần		
VW	100	100	100	+++	+++
H (Hyponex)	100	66,67	100	+	+
MS	100	100	100	++	++

Ghi chú: +++: chất lượng tốt, màu xanh đậm; ++: chất lượng trung bình, màu xanh; +: chất lượng kém, màu xanh nhạt

trùng mẫu quả của các giống lan (Millner et al., 2008) (Hoàng Thị Nga và cs., 2008). Kế thừa các kết quả đó chúng tôi tiến hành khử trùng quả lan 5 tháng tuổi theo công thức: khử trùng bằng xà phòng → rửa dưới vòi nước chảy → rửa sạch quả lan bằng cồn → lắc đều trong dung dịch Johnson 15 phút (trong tủ cấy) → rửa lại 2 lần bằng nước cất (trong tủ cấy) → lắc đều trong dung dịch Johnson 3 phút (trong tủ cấy) → rửa lại 3 lần bằng nước cất (trong tủ cấy) → Gấp quả ra và xẻ lấy hạt cấy vào môi trường đã được chuẩn bị sẵn.

Quả lan sau khi được khử trùng, xẻ lấy hạt cấy vào các môi trường nền: MS (Murashige & Shoog, 1962), VW (Vacin & Went, 1949), Hyponex. Hạt lan mới gieo sẽ rất mịn và có màu vàng chanh. Sau 8 tuần nuôi cấy thu được kết quả ở bảng 1.

Kết quả bảng 1 cho thấy gieo hạt lan trên 3 loại môi trường (MS, VW và H) sau 8 tuần nuôi cấy, các hạt đã nảy chồi 100% trên nền môi trường MS và VW. Hạt gieo trên nền môi trường VW cho tỷ lệ hạt có màu xanh cao nhất, sau 6 tuần nuôi cấy cho tỷ lệ mẫu phát sinh chồi cao nhất (100%). Hạt được gieo trên nền môi trường H cho tỷ lệ mẫu có màu xanh thấp nhất sau 8 tuần nuôi cấy.

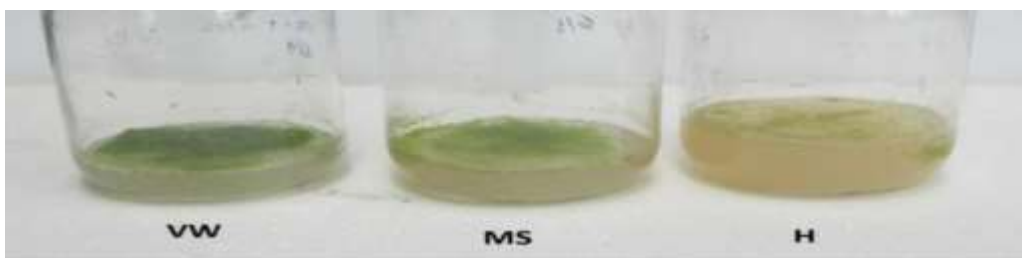
Về hình thái, chồi tốt nhất trên môi trường nền VW (đồng đều màu xanh bóng, không bị xốp, không bị mọng nước, chồi phát triển mạnh không bị biến dị), tiếp đến là MS. Vì vậy, môi trường VW + 10g sucrose/lít môi trường + 6g agar/lít môi trường + 10% ND là môi trường thích hợp nhất cho sự nảy mầm của hạt lan *D. officinale* Kimura et Migo.



Vật liệu vào mẫu (Sau 4 tuần nuôi cấy)



Mẫu gieo trên môi trường VW (8 tuần)



Hình 1. Kết quả gieo hạt lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo.

3.1.2. Nhân nhanh cụm chồi

a. Ảnh hưởng của nền môi trường nuôi cấy đến khả năng nhân nhanh cụm chồi

Việc xác định được môi trường tối ưu để nuôi cấy nhân nhanh chồi, làm tăng hệ số nhân, đồng thời các chồi đều đạt chất lượng tốt không bị biến dị trước khi chuyển sang môi trường tạo cây hoàn chỉnh là một yêu cầu không thể thiếu trong nhân *in vitro*. Mỗi công thức cấy 3 bình, mỗi bình thí nghiệm 5 cụm chồi có chiều cao 7mm, mỗi cụm có chứa 05 chồi.

Theo kết quả trình bày trên bảng 2 cho thấy: Các công thức khác nhau có ảnh hưởng khác nhau đến số chồi/cụm và hệ số nhân (HSN) chồi của giống lan nghiên cứu. Môi trường MS (CT1) rất phù hợp cho quá trình tăng nhanh về số lượng chồi (14,02 chồi/cụm) và HSN chồi (2,8 lần/4 tuần) trong nuôi cấy cụm chồi. Môi trường

MS và VW cho số lượng chồi, HSN chồi thấp hơn so với nền môi trường MS lần lượt là (12,29 chồi/cụm; 2,46 lần/4 tuần) và (12,09 chồi/cụm; 2,42 lần/4 tuần). Môi trường VW (CT4) cho số chồi/cụm (10,49 chồi) và HSN (2,1 lần) là thấp nhất sau 4 tuần nuôi cấy. Ở độ tin cậy 95%, số

chồi/cụm và HSN chồi ở CT1 sai khác có ý nghĩa so với các công thức khác. Như vậy, môi trường nuôi cấy được lựa chọn trong nhân nhanh cụm chồi lan *D. officinale* Kimura et Migo. là môi trường MS + 20g sucrose + 10% nước dừa + 6g agar/lít môi trường.

b. Nghiên cứu ảnh hưởng của dịch nghiền củ, quả đến khả năng nhân nhanh cụm chồi

Cấy vào mỗi bình thí nghiệm 5 cụm chồi có chiều cao 7mm, mỗi cụm có chứa 05 chồi được đưa vào nuôi cấy trên nền môi trường MS có bổ sung các dịch nghiền (khoai tây, cà rốt, táo, chuối) qua đó xác định được ảnh hưởng của các chất bổ sung này đến khả năng nhân nhanh của cụm chồi. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Kết quả cho thấy ở các công thức bổ sung riêng lẻ các dịch nghiền vào môi trường nuôi cấy thì CT5 (60 gam chuối chín/lít môi trường) cho số chồi TB/cụm nhiều nhất (16,20 chồi/cụm) và HSN chồi cao nhất (đạt 3,24 lần). Các công thức có bổ sung kết hợp các dịch nghiền vào môi trường nuôi cấy không cho kết quả vượt trội theo tính cộng hợp mà ở các công thức từ CT6-CT11 đều cho các chỉ tiêu số chồi/cụm và HSN

Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường nền đến khả năng nhân nhanh cụm chồi (sau 4 tuần nuôi cấy)

CTTN	Tỷ lệ mẫu sống và nhân chồi (%)	Số chồi TB/bình	HSN chồi (lần)	Hình thái mẫu
CT1 (MS)	100	14,02	2,80	Xanh đậm
CT2 (½ MS)	100	12,29	2,46	Xanh nhạt
CT3 (VW)	100	12,09	2,42	Xanh đậm
CT4 (½ VW)	100	10,49	2,10	Xanh
CT5 (H)	100	11,78	2,36	Xanh nhạt
LSD _{0,05}		0,67	0,14	
CV%		3,00	3,10	



Hình 2. Kết quả nhân nhanh chồi trên các môi trường nền (sau 4 tuần nuôi cấy)

Bảng 3. Ảnh hưởng của dịch nghiền củ, quả đến khả năng nhân nhanh cụm chồi (sau 8 tuần)

CTTN	Số chồi TB/cụm	HSN chồi (lần)	Hình thái mẫu
CT1(ĐC)	14,02	2,80	+, c
CT2: ĐC + 60g khoai tây/lít môi trường	15,00	3,00	+, c
CT3: ĐC + 60g cà rốt/lít môi trường	13,73	2,74	++, c
CT4: ĐC + 60g táo/lít môi trường	14,46	2,89	++, b
CT5: ĐC + 60g chuối/lít môi trường	16,20	3,24	++, a
CT6: ĐC + 60g khoai tây + 60g cà rốt/lít môi trường	13,53	2,71	++, b
CT7: ĐC + 60g khoai tây + 60g táo/lít môi trường	13,40	2,68	++, b
CT8: ĐC + 60g khoai tây + 60g chuối/lít môi trường	14,67	2,93	++, b
CT9: ĐC + 60g cà rốt + 60g táo/lít môi trường	14,33	2,87	++, b
CT10: ĐC + 60g cà rốt + 60g chuối/lít môi trường	14,13	2,83	++, b
CT11: ĐC + 60g táo + 60g chuối/lít môi trường	13,33	2,67	++, b
LSD _{0,05}	0,45	0,13	
CV%	2,7	2,8	

Ghi chú: ++, +: Sắc xanh vừa, xanh nhạt của cụm chồi; a: Thân mập; b: Thân trung bình; c: Thân mảnh; ĐC = Môi trường MS + 100ml ND + 20g sucrose + 6g agar/lít môi trường

chồi thấp hơn CT5. Điều này cho thấy việc kết hợp các chất tự nhiên vào cùng môi trường nhân chồi không mang lại hệ số nhân chồi tăng cao như mong muốn. Ở độ tin cậy 95%, số chồi/cụm thu được và HSN chồi đạt được sau 8 tuần nuôi cấy ở công thức 5 cao hơn so với các công thức khác. Môi trường MS + 100ml ND + 20g sucrose + 6g agar + 60g chuối chín/lít môi trường là tối ưu cho nhân nhanh cụm chồi loài lan nghiên cứu. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Vũ Ngọc Lan và cs., (2013) khi nhân nhanh cụm chồi lan thuốc *D.nobile* Lindl. Kết quả nghiên cứu trên lan hài Hạng (*P. hangianum* Gurss.) khi nhân nhanh chồi cho biết cần bổ sung lượng chuối cao hơn, lên đến 100g chuối/lít môi trường (Hoàng Thị Giang và cs., 2010).

3.2. Nhân giống vô tính thông qua nuôi cấy đoạn thân *in vitro* mang mắt ngủ

3.2.1. Ảnh hưởng của số đốt trên đoạn thân *in vitro* đến sinh trưởng chồi

Cây lan *in vitro* được cắt thành những đoạn mang 1-2-3-4 mắt ngủ và được đưa vào nuôi cấy trên môi trường nền MS để tìm hiểu ảnh hưởng của số đốt trên đoạn thân *in vitro* đến sinh trưởng của chồi.

Kết quả cho thấy các đoạn thân mang mắt ngủ đều tái sinh chồi. Đoạn thân mang 2 mắt ngủ cho sinh trưởng mạnh nhất, thể hiện qua chiều cao chồi, đường kính chồi, số chồi và màu sắc lá xanh tốt hơn hẳn so với các công thức còn lại. Do đó, thân mang 2 mắt ngủ được chọn để bố trí thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 4. Ảnh hưởng của số trên đoạn thân đến sinh trưởng chồi *in vitro* (sau 8 tuần)

CTTN	Chiều cao chồi TB (cm)	Số chồi TB/đoạn thân	Đường kính chồi (mm)	Màu sắc lá
CT1: Đoạn thân mang 1 mắt ngủ	4,73	4,93	4,36	xanh nhạt
CT2: Đoạn thân mang 2 mắt ngủ	5,93	6,16	5,50	xanh đậm
CT3: Đoạn thân mang 3 mắt ngủ	4,96	4,03	4,71	xanh nhạt
CT4: Đoạn thân mang 4 mắt ngủ	4,06	4,66	4,53	xanh nhạt
LSD _{0,05}	0,245	0,214	0,433	
CV%	1,95	2,29	4,82	

3.2.2. Ảnh hưởng của BA kết hợp NAA đến sinh trưởng của đoạn thân mang 2 mắt ngủ *in vitro*

Tỷ lệ auxin/cytokinin rất quan trọng đối với sự phát sinh hình thái trong các hệ thống nuôi cấy. Sự kết hợp auxin và cytokinin với một tỷ lệ nhất định đôi khi không những cải thiện được khả năng tái sinh mà còn làm tăng sự sinh trưởng của chồi. Do vậy, nghiên cứu này tiến hành thử nghiệm các công thức tạo sự phát sinh hình thái với các tổ hợp của BA và NAA ở các nồng độ khác nhau.

Kết quả bảng 5 cho thấy, bổ sung nồng độ BA kết hợp với α NAA hợp lý vào môi trường nuôi cấy là rất hiệu quả cho tái sinh chồi giống lan nghiên cứu từ đoạn thân mang mắt ngủ. Tỷ lệ mẫu phát sinh hình thái, tạo chồi, số

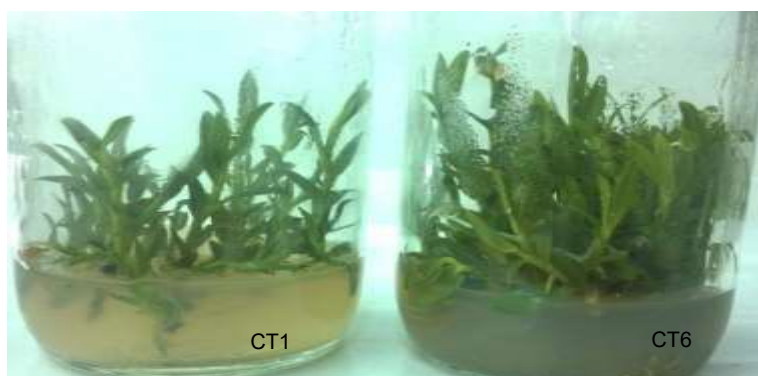
chồi/mẫu và chiều cao chồi thu được trên môi trường chứa BA và α NAA cao hơn so với công thức đối chứng. Sau thời gian 8 tuần đều có sự khác nhau về giá trị của các chỉ tiêu nghiên cứu. Môi trường MS có bổ sung BA (0,5 mg/l môi trường) + α NAA (0,2 mg/l môi trường) tốt nhất cho việc phát sinh hình thái chồi; chiều cao chồi; số chồi; số lá/chồi. Chiều cao chồi là 6,26cm; số chồi trung bình/đoạn thân là 8,00; số lá trung bình là 8,10 lá/chồi, lá có màu xanh đậm, mập.

Như vậy, môi trường MS + 20g sucrose + 10% ND + 0,5 mg/l BA + 0,5 mg/l α -NAA + 6g agar/lít môi trường là thích hợp cho việc phát sinh chồi giống lan *D. officinale* Kimura et Migo. tương tự với kết quả của Li (2012) khi nghiên cứu nhân nhanh giống lan này tại Trung Quốc.

Bảng 5. Ảnh hưởng của BA + NAA đến sinh trưởng của đoạn thân mang 2 mắt ngủ *in vitro* (sau 8 tuần)

CTTN	Chiều cao chồi (cm)	Số chồi TB/đoạn thân	Số lá TB (lá)	Màu sắc lá	Đường kính thân
CT1: ĐC	4,06	2,73	5,10	xanh nhạt	mảnh
CT2: ĐC + 0,3 mg/l BA + 0,1 mg/l α NAA	4,46	3,86	5,86	xanh nhạt	mảnh
CT3: ĐC + 0,3 mg/l BA + 0,2 mg/l α NAA	5,33	5,10	6,73	xanh nhạt	mảnh
CT4: ĐC + 0,3 mg/l BA + 0,3 mg/l α NAA)	5,60	6,73	7,00	xanh nhạt	mảnh
CT5: ĐC + 0,5 mg/l BA + 0,1 mg/l α NAA)	5,26	6,20	6,73	xanh nhạt	mập
CT6: ĐC + 0,5 mg/l BA + 0,2 mg/l α NAA)	6,26	8,00	8,10	xanh đậm	mập
CT7: ĐC + 0,5 mg/l BA + 0,3 mg/l α NAA)	4,60	5,10	6,86	xanh nhạt	mập
LSD _{0,05}	0,334	0,305	0,315		
CV%	2,73	2,78	2,19		

Ghi chú: ĐC = Môi trường MS + 20g sucrose + 10% nước dừa (ND) + 6g agar/lít môi trường



Hình 3. Ảnh hưởng của BA kết hợp NAA đến sinh trưởng của đoạn thân mang 2 mắt ngủ *in vitro* (sau 8 tuần)

3.3. Tạo cây hoàn chỉnh

3.3.1. Ảnh hưởng của nền môi trường nuôi cấy đến khả năng tạo rễ của chồi

Đây là giai đoạn cuối cùng của quá trình nhân nhanh *in vitro*. Với mục đích tạo cây con có sức sống cao, đạt tiêu chuẩn ra cây. Tiến hành lấy chồi thu được từ các thí nghiệm trên tách riêng rẽ cấy trên 7 môi trường nền khác nhau, mỗi công thức cấy 3 bình, mỗi bình cấy 5 chồi, mỗi chồi có chiều cao 3cm, 3 lá. Kết quả sau 30 ngày nuôi cấy được thể hiện qua bảng 6.

Kết quả bảng 6 cho thấy: sau 30 ngày nuôi cấy, ở tất cả các công thức với nền môi trường khác nhau đều cho tỷ lệ chồi tạo rễ là 100%. Trên nền môi trường RE (CT5) cho số rễ nhiều nhất là 3,53 rễ/chồi. Về chỉ tiêu chiều dài trung bình/rễ, nuôi cấy trên môi trường RE cũng cho

giá trị cao hơn so với các môi trường khác là 2,8cm. Vậy, nuôi cấy chồi lan *D. officinale* Kimura et Migo. trên môi trường RE + 10g sucrose + 6g agar + 0,3g THT/lít môi trường là tối ưu để tạo cây hoàn chỉnh.

3.3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của α -NAA đến khả năng sinh rễ của chồi

Đối với nuôi cấy mô và tế bào thực vật, auxin được sử dụng để kích thích phân chia tế bào và phân hóa rễ. Những auxin thường dùng rộng rãi trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật là α NAA, IAA... Để tăng khả năng ra rễ cho chồi giống lan *D. officinale* Kimura et Migo. chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm với 5 công thức trên nền môi trường RE có bổ sung nồng độ α -NAA khác nhau. Sau 30 ngày nuôi cấy và theo dõi thu được kết quả như sau:

Bảng 6. Ảnh hưởng của nền môi trường đến khả năng ra rễ của chồi (sau 30 ngày nuôi cấy)

CTTN	Tỷ lệ chồi tạo rễ (%)			Số rễ TB/chồi	Chiều dài TB rễ (cm)
	10D	20D	30D		
CT1 (MS)	0	91,11	100	2,73	1,20
CT2 (1/2 MS)	0	84,44	100	2,07	1,60
CT3 (VW)	0	91,11	100	2,87	1,50
CT4 (1/2 VW)	0	93,33	100	3,00	1,83
CT5 (RE)	0	100	100	3,53	2,80
CT6 (1/2 RE)	0	97,78	100	3,20	2,20
CT7 (H)	0	95,56	100	2,67	1,25
LSD _{0,05}				0,14	0,14
CV%				2,70	4,40

Ghi chú: D là ngày

Bảng 7. Ảnh hưởng của α NAA đến khả năng ra rễ của chồi (sau 30 ngày nuôi cấy)

CTTN	Tỷ lệ chồi tạo rễ (%)	Số rễ TB/chồi	Chiều dài TB rễ (cm)
	Sau 10D		
CT1: ĐC	100,00	3,51	2,74
CT2: ĐC + 0,2 mg/l α NAA	100,00	3,89	2,84
CT3: ĐC + 0,5 mg/l α NAA	100,00	4,51	3,19
CT4: ĐC + 0,7 mg/l α NAA	100,00	4,25	2,90
CT5: ĐC + 1,0 mg/l α NAA	100,00	4,11	2,77
LSD _{0,05}		0,33	0,18
CV%		4,10	3,40

Ghi chú: ĐC = Môi trường RE + 10g sucrose+ 6g agar + 0,3g THT/lít môi trường; D: ngày



Hình 5. Kết quả ra rễ của chồi lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. trên môi trường RE có bổ sung α NAA (sau 30 ngày nuôi cấy)

Các công thức có bổ sung α NAA và ĐC sau 10 ngày nuôi cấy đều cho số chồi tạo rễ đạt 100% nhưng số rễ/cây và chiều dài rễ ở các công thức khác nhau là khác nhau. Ở CT3 có bổ sung 0,5mg α NAA/lít môi trường nuôi cấy cho số rễ nhiều nhất là 4,51 rễ/chồi và chất lượng rễ là tốt nhất. Tuy nhiên, trên môi trường có bổ sung α NAA nhiều hơn (CT4, CT5) hoặc ít hơn (CT2) thì cây có số rễ ít hơn và chất lượng rễ kém hơn. Vậy, trên môi trường RE +10g sucrose+ 6g agar + 0,3g THT/lít môi trường bổ sung 0,5mg α NAA/lít môi trường vào môi trường nuôi cấy chồi lan *D. officinale* Kimura et Migo. là tối ưu để tạo cây hoàn chỉnh.

4. KẾT LUẬN

Môi trường VW + 10g sucrose + 6g agar + 100ml ND/lít môi trường là tối ưu ở giai đoạn nuôi cấy khởi động hạt lan *D. officinale* Kimura et Migo., tỷ lệ hạt nảy mầm là 100%. Môi trường nuôi cấy tối ưu để nhân nhanh cụm chồi giống lan *D. officinale* Kimura et Migo. là MS + 100ml ND + 20g sucrose + 6g agar + 60g chuối chín/lít môi trường, hệ số nhân chồi đạt 2,8 lần/sau 4 tuần nuôi cấy.

Nhân giống vô tính thông qua nuôi cấy đoạn thân mang mắt ngủ: Đoạn thân *in vitro* mang 2 mắt ngủ và nuôi cấy trên môi trường MS + 20g sucrose + 10% ND + 0,5 mg/l BA + 0,5mg/l α NAA+ 6g agar/lít môi trường là thích hợp cho chiều cao chồi là 6,26cm; số chồi trung bình/đoạn thân là 8; số lá trung bình là 8,10 lá/chồi, lá có màu xanh đậm, mập.

Môi trường RE + 10g sucrose+ 6g agar+ 0,3g THT + 0,5 α NAA/lít môi trường là tối ưu ở giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh giống lan *D. officinale* Kimura et Migo. với tỷ lệ cây ra rễ đạt 100%, số rễ trung bình là 4,51 rễ/chồi; chiều dài rễ trung bình là 3,19cm sau 30 ngày nuôi cấy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hoàng Thị Giang, Nguyễn Quang Thạch, Mạch Hồng Thắm, Đỗ Thị Thu Hà (2010). Nghiên cứu nhân giống *in vitro* và nuôi trồng giống lan hải quý *P. hangianum perner* Gurss (Hải Hăng) thu thập ở Việt Nam. Tạp chí Khoa học và Phát triển, 8(2): 194-201.
- Vũ Ngọc Lan, Nguyễn Thị Lý Anh (2013). Nhân giống *in vitro* loài lan bản địa *Dendrobium nobile* Lindl. Tạp chí Khoa học và Phát triển, 11(7): 917-925.
- Trần Văn Minh, Nguyễn Văn Uyển (2001). Vi nhân giống phong lan nhóm *Dendrobium* trên quy mô công nghiệp, nhân giống *in vitro*. Tạp chí Khoa học Công nghệ, 1: 9.
- Hoàng Thị Nga, Nguyễn Quang Thạch, Đỗ Đức Thịnh, Hoàng Minh Tú (2008). Xây dựng quy trình nhân nhanh giống địa lan Hồng hoàng (*Cymbidium iridioides*) bằng kỹ thuật nuôi cấy mô. Tạp chí Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp, 4: 387-394.
- Nguyễn Văn Song và cs. (2011). Nhân nhanh *in vitro* lan Kim Điệp (*Dendrobium chrysotoxum*) - một loài lan rừng có nguy cơ tuyệt chủng. Tạp chí khoa học ĐH Huế, 64: 127-136.
- Nguyễn Thị Sơn, Nguyễn Thị Lý Anh, Vũ Ngọc Lan, Trần Thế Mai (2012). Nhân giống *in vitro* loài lan *Dendrobium fimbriatum* Hook. (Hoàng Thảo Long nhân). Tạp chí Khoa học và Phát triển, 10(2): 263 - 271.
- Nguyễn Thị Sơn, Trần Thế Mai, Hoàng Thị Nga, Nguyễn Thị Lý Anh, Nguyễn Quang Thạch (2013).

- Nghiên cứu ứng dụng hệ thống bioreactor plantima trong nhân giống loài lan Hoàng Thảo Thạch học (*Dendrobium nobile* Lindl.). Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2: 28-34.
- Anjum S, Zia M and Chaudhary MF (2006). Investigation of different strategies for high frequency regeneration of *Dendrobium malones* "Victory". African Journal of Biotechnology, 5(19): 1738-1743
- Chu Chu, Huimin Yin, Li Xia, Dongping Cheng, Jizhong Yan, and Lin Zhu (2014). Discrimination of *Dendrobium officinale* and Its Common Adulterants by Combination of Normal Light and Fluorescence Microscopy. Molecules, 19(3): 3718-3730.
- Helen J. Millner, Abraham Obeng, Alison R. McCrea, and Timothy C. Baldwin (2008). Axenic seed germination and in vitro seedling development of *Restrepia brachypus* (Orchidaceae). Journal of the Torrey Botanical Society, 135(4): 497-505.
- Kalimuthu K, Senthikumar R and Vijaykumar S (2006). *In vitro* micropropagation of orchid, *Oncidium* sp. (Dancing Dolls). African Journal of Biotechnology, 6(10): 1171-1174.
- Kauth P. (2005). In vitro seed germination and seedling development of *Calopogon tuberosus* and *Sacoila lanceolata* var. *lanceolata*: Two Florida native terrestrial orchids, Master thesis, University of Florida
- Kowitdamrong, A.; Chanvorachote, P.; Sritularak, B.; Pongrakhananon, V. (2013). Moscatilin inhibits lung cancer cell motility and invasion via suppression of endogenous reactive oxygen species. Biomed. Res. Int., 765894.
- Luan VQ, Thien NQ, Khiem DV and Nhut DT (2006). In vitro germination capacity and plant recover of some native and rare orchids, Proceedings of International Workshop on Biotechnology of Agriculture, p. 175-177.
- Li Hong -lin, Zan Yan-yan, Yang Bo (2012). Tissue culture of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo., Subtropical Plant Science, 41(3): 76-77.
- McKendrick (2000). In vitro germination of orchids: a manual, Ceiba Foundation for Tropical Conservation, p. 1-17
- S.Gu, X. Y. Ding, Y. Wang, Q. Zhou, G. Ding, X. X. Li and Qian (2007). Isolation and characterization of microsatellite markers in *Dendrobium officinale*, an endangered herb endemic to China. Molecular Ecology Notes, 7: 1166-1168.