

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT NUÔI CÂY *IN VITRO* TRONG NHÂN GIỐNG LAN PHI ĐIỆP TÍM HOÀ BÌNH (*Dendrobium anosmum* Lindley)

Đỗ Quỳnh Liên¹, Đoàn Thị Thu Hương¹, Nguyễn Văn Việt¹, Vũ Tiến Hưng¹

¹Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Phi điệp tím Hòa Bình (*Dendrobium anosmum* Lindley) là loài lan quý, có giá trị kinh tế cao, hoa mọc thành từng chùm buông xuống với nhiều hoa nhỏ màu tím và có hương thơm dễ chịu. Nhân giống *in vitro* Phi điệp tím Hòa Bình đã được nghiên cứu thành công. Kết quả chỉ ra, sát khuẩn bề mặt quả lan bằng ethanol 70% trong 2 phút, sau đó khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 10 phút và nuôi cấy mẫu hạt trên môi trường dinh dưỡng cơ bản MS, đã cho tỷ lệ mẫu sạch là 94,6%, tỷ lệ mẫu phát sinh thể chồi là 93,3% với thời gian phát sinh chồi là 23 ngày. Cầm ứng tạo đa chồi trên môi trường bổ sung 0,8 mg/l BAP, 0,2 mg/l NAA, 0,5 mg/l Kinetin, 100 g/l khoai tây nghiền, 100 ml/l nước dừa, 30 g/l sucrose, 6,5 g/l agar cho tỷ lệ tạo cụm chồi là 96,8%, hệ số nhân chồi là 13,7 lần. Chồi ra rễ 94,3%, số rễ trung bình 3,5 rễ/cây và chiều dài rễ trung bình 3,0 cm khi nuôi trên môi trường MS bổ sung 0,2 mg/l IBA, 0,3 mg/l NAA, 100 g/l khoai tây nghiền, 20 g/l sucrose sau 5 tuần. Khi cây có chiều cao lớn hơn 4 cm, có khoảng 3 - 4 rễ đem bình cây ra huấn luyện ở điều kiện ánh sáng tán xạ trong 10 ngày, sau đó đưa cây ra trồng trên giá thể, tỷ lệ sống đạt 98,03% sau 6 tuần ra ngoài.

Từ khóa: Cụm chồi, *Dendrobium anosmum* Lindley, nuôi cấy *in vitro*, Phi điệp tím Hòa Bình.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, hoa cây cảnh không những đóng vai trò quan trọng trong đời sống tinh thần mà còn làm đẹp cho cảnh quan môi trường. Hoa lan là một trong những loại hoa được ưa chuộng vì hình dáng đẹp, màu sắc tươi sáng, kích thước đa dạng. Trong đó, Phi điệp tím Hòa Bình (*Dendrobium anosmum* Lindley), là giống hoa quý trong rừng nhiệt đới được nhiều người ưa chuộng không chỉ bởi khuôn bông đẹp, cây sai hoa mà còn đẹp cả về màu sắc lẫn hình dáng.

Hoa Phi điệp tím Hòa Bình có cánh to hơn, có màu đậm hơn và có hương thơm đặc biệt hơn hoa Phi điệp ở khu vực phân bố khác. Ngoài giá trị làm cảnh phi điệp có thể làm thuốc để điều trị nhiều bệnh về da, suy nhược thần kinh và tăng cường sức đề kháng cho cơ thể. Mặc dù vậy, khả năng tái sinh cây từ hạt Phi điệp tím Hòa Bình rất kém, vì hạt lan không nhũ, trong tự nhiên hạt muốn nảy mầm phải có sự xuất hiện của nấm cộng sinh *Rhizoctonia* nên khả năng tự tái sinh từ hạt là rất kém. Ngoài ra, nhân giống hoa lan bằng con đường sinh dưỡng thường rất hạn chế, hệ số nhân giống thấp và ảnh hưởng lớn tới cây mẹ (Nguyễn Quỳnh Trang và cộng sự, 2013).

Để đáp ứng nhu cầu của thị trường cây giống cần khắc phục các tồn tại trên. Bằng công nghệ nhân giống tiên tiến - nuôi cấy *in vitro*, với hệ số nhân giống từ một quả lan là rất lớn (Trần Văn Minh, 2001). Do đó, ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* trong nhân giống hoa lan từ phôi hạt trong ống nghiệm đã mang lại hiệu quả cao. Trên thế giới cũng như ở Việt Nam có nhiều nghiên cứu về nhân giống *in vitro* cây *Dendrobium* đã được thực hiện (Jaime A *et al.*, 2015; Lita S *et al.*, 2012; Sana A *et al.*, 2011; Nguyễn Văn Kết và cộng sự, 2010; Nguyễn Thị Sơn và cộng sự, 2012; Vũ Kim Dung và cộng sự, 2016, Nguyễn Văn Việt, 2017). Tuy nhiên, các nghiên cứu về nhân giống loài lan trên mới chỉ tập trung vào kỹ thuật nhân nhanh. Bài báo công bố kết quả nhân giống *in vitro* lan Phi điệp tím Hòa Bình đạt hiệu quả cao, góp phần vào công tác bảo tồn nguồn gen loài lan có giá trị thẩm mỹ cao này.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu: Quả lan Phi điệp tím Hòa Bình có tuổi chín sinh lý 90%, thu thập tại gia đình ông Bùi Huy Toàn - xã Tử Nê, huyện Tân Lạc, tỉnh Hòa Bình.

Hóa chất dùng để khử trùng mẫu là dung

dịch $HgCl_2$ 0,1%; $NaClO$ 6%.

Các loại vật liệu và hóa chất dùng trong nuôi cấy mô tế bào là loại thông dụng dùng cho nghiên cứu trong phòng thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp nghiên cứu chung

Bố trí thí nghiệm theo phương pháp sinh học thực nghiệm, lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp có dung lượng mẫu lớn ($n \geq 30$), số liệu thu thập sau 5 tuần.

Điều kiện nuôi cấy: Chiếu sáng bằng đèn neon cường độ 2000 đến 3000 lux, 14 giờ/ngày; nhiệt độ phòng nuôi $24 \pm 2^{\circ}C$. Môi trường nuôi cấy được chuẩn độ $pH = 5,8$; khử trùng môi trường ở $118^{\circ}C$, áp suất 1 atm trong 18 phút.

2.2.2. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của kỹ thuật khử trùng đến tạo mẫu sạch và tái sinh thể chồi.

Quả lan được làm sạch, sau đó sát khuẩn bằng ethanol 70% trong 2 phút. Khử trùng mẫu bằng dung dịch $HgCl_2$ 0,1% (5 - 15 phút) hoặc $NaClO$ 6% (15 - 25 phút). Tách vỏ quả, trái hạt lên môi trường nuôi cấy khởi động là môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung thêm 30 g/l sucrose, 6,5 g/l agar. Thống kê số mẫu sạch, số mẫu nảy mầm và thời gian nảy mầm.

Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng đến nhân nhanh thể chồi.

Dùng môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung (0,2 đến 1,0 mg/l) BAP, (0,3 đến 0,4 mg/l) Kinetin và 0,2 mg/l NAA; 30 g/l sucrose, 6,5 g/l agar, 100 g/l khoai tây nghiền, 100 ml/l nước dừa. Thống kê số thể chồi tạo ra, quan sát đặc điểm hình thái thể chồi sau 6 tuần nuôi cấy.

Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến nhân nhanh chồi.

Thí nghiệm này sử dụng các môi trường dinh dưỡng cơ bản: Knops, MS, WPM bổ sung 0,1 mg/l BAP, 30 g/l sucrose, 6,5 g/l agar, 100 g/l khoai tây nghiền, 100 ml/l nước dừa. Thống kê số chồi tạo ra/mẫu cấy, đặc điểm chồi sau 6 tuần nuôi cấy.

Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng đến nhân nhanh chồi.

Dùng môi trường dinh dưỡng phù hợp nhất ở thí nghiệm 3, bổ sung BAP (0,2 đến 2,0 mg/l), Kinetin (0,1 đến 1,5 mg/l) và 0,2 mg/l NAA; 30 g/l sucrose, 6,5 g/l agar, 100 g/l khoai tây nghiền, 100 ml/l nước dừa. Thống kê số chồi tạo ra/mẫu cấy, đặc điểm chồi sau 6 tuần nuôi cấy.

Thí nghiệm 5: Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng ra rễ.

Dùng môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung IBA (0,1 đến 0,4 mg/l), NAA (0,2 đến 0,4 mg/l), 20 g/l sucrose, 6,5 g/l agar, 100 g/l khoai tây nghiền, 100 ml/l nước dừa. Thống kê số rễ/cây, đo chiều dài rễ sau 5 tuần nuôi cấy.

Thí nghiệm 6: Ảnh hưởng của thời gian huấn luyện đến tỷ lệ sống và chất lượng cây giống.

Bình nuôi có cây hoàn chỉnh đưa ra ngoài ánh sáng tán xạ để huấn luyện với thời gian khác nhau (0, 7; 10; 14 ngày) trước khi ra ngôi. Sau 6 tuần theo dõi, thống kê số mẫu sống, đặc điểm sinh trưởng của cây.

2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Xử lý số liệu theo phương pháp thống kê sinh học ứng dụng các phần mềm đã lập trình trên máy tính điện tử như Excel và SPSS 20.1.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào thực vật - Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo mẫu sạch và tái sinh thể chồi *in vitro*

Trong quy trình kỹ thuật nhân giống cây trồng bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*, tỷ lệ mẫu sạch có khả năng tái sinh chồi có ý nghĩa rất quan trọng đối với các bước tiếp theo. Việc xác định công thức khử trùng tối ưu để nâng cao hiệu quả tạo mẫu sạch *in vitro* và khả năng nảy mầm của mẫu sạch. Môi trường nuôi cấy là môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung 30 g/l sucrose, 6,5 g/l agar. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của hóa chất và thời gian khử trùng đến tạo mẫu sạch và nảy mầm

Loại hóa chất	Thời gian (phút)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu nảy mầm (%)	Thời gian nảy mầm (ngày)
HgCl ₂ 0,1%	5	73,3	73,1	20,5
	10	94,6	93,3	23,5
	15	100	76,7	25,0
NaClO 6%	15	76,7	76,3	20,5
	20	91,1	89,7	22,0
	25	100	70,0	23,5
	Sig	0,0013	0,0001	

Từ kết quả thu được (Bảng 1) cho biết, khi dùng dung dịch HgCl₂ 0,1% với thời gian khử trùng 5 đến 15 phút hoặc dung dịch NaClO 6% với thời gian 15 đến 25 phút, tỷ lệ mẫu sạch tương đối cao, đạt giá trị từ 73,3 đến 100% (Hình 1a). Trong đó, ảnh hưởng của từng loại hóa chất đến hiệu quả khử trùng là rõ rệt với thời gian khử trùng khác nhau. Khi tăng thời gian khử trùng thì tỷ lệ mẫu sạch đều tăng, nhưng tỷ lệ mẫu nảy mầm có xu hướng giảm, tỷ lệ nảy mầm đạt 70 đến 93,3% chứng tỏ hóa chất khử trùng có thể làm sạch mẫu nhưng đều là chất rất độc, nếu khử trùng lâu hóa chất sẽ ngấm vào mô thực vật sẽ làm hỏng hoặc gây độc, do đó hạt không thể nảy mầm (Lita S. *et al.*, 2012). Kết quả trên tương ứng với công bố của Nguyễn Văn Việt và cộng sự (2016) khi sử dụng hóa chất HgCl₂ 0,1% khử trùng mẫu quả Quế lan hương trong 15 phút, đạt tỷ lệ mẫu sạch 94,33%, tỷ lệ mẫu nảy mầm là 88,67% sau 40 ngày nuôi cấy. Với công bố của Vũ Kim Dung và cộng sự (2016) cho kết quả khả quan hơn khi khử trùng

quả lan Hoàng thảo ý thảo ba màu bằng HgCl₂ 0,1% trong 10 phút (lần 1: 7 phút; lần 2: 3 phút), tỷ lệ tạo mẫu sạch đạt 96,67%, tỷ lệ mẫu nảy mầm đạt 90%. Căn cứ vào kết quả ở bảng 1, có thể chọn dung dịch HgCl₂ 0,1%, để khử trùng mẫu với thời gian 10 phút hoặc NaClO 6% khử trùng mẫu trong 20 phút là phù hợp. Kết quả phân tích thống kê cũng cho thấy tỷ lệ mẫu sạch và tỷ lệ nảy mầm tại các công thức thí nghiệm là sự sai khác có ý nghĩa (Sig < 0,05).

3.2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh thể chồi

Thể chồi tái sinh từ hạt lan trong môi trường nuôi cấy khởi động được cấy chuyển sang môi trường nhân nhanh thể chồi. Thí nghiệm được bố trí gồm 8 công thức có sử dụng các chất điều hòa sinh trưởng thực vật với nồng độ khác nhau và 1 công thức đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Sau 6 tuần theo dõi và thu thập số liệu về hệ số tạo thể chồi, đặc điểm thể chồi. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ các chất ĐHST đến khả năng nhân nhanh thể chồi (sau 6 tuần nuôi cấy)

CT	Chất ĐHST (mg/l)			Hệ số nhân thể chồi (lần)	Đặc điểm thể chồi
	BAP	Kinetin	NAA		
ĐC	-	-	-	4,0	+
TC ₁	0,2	0,4	0,1	8,2	+
TC ₂	0,5	0,4	0,1	10,3	++
TC ₃	0,7	0,4	0,1	10,5	++
TC ₄	1,0	0,4	0,1	9,9	++
TC ₅	0,2	0,3	0,1	9,8	+
TC ₆	0,5	0,3	0,1	13,8	+++
TC ₇	0,7	0,3	0,1	11,3	+++
TC ₈	1,0	0,3	0,1	10,2	++
	Sig			0,0001	

Ghi chú: +: chồi nhỏ, ngắn, màu xanh nhạt; ++: chồi trung bình, kích thước không đồng đều; +++: chồi mập, màu xanh đậm, đồng đều.

Kết quả cho thấy (Bảng 2), nuôi cấy thể chồi trên môi trường MS có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến quá trình tạo thể chồi *in vitro*. Ở công thức đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật, hệ số nhân thể chồi thấp (4,0 lần), chất lượng thể chồi kém, kích thước nhỏ. Đặc biệt công thức TC₆ đã cho hệ số tạo thể chồi cao nhất, đạt 13,8 lần (Hình 1b) và thể chồi mập, màu xanh. Hệ số tạo thể chồi lan Phi điệp tím trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BAP, 0,3 mg/l Kinetin, 0,1 mg/l NAA cao hơn so với công bố của Nguyễn Thị Sơn và cộng sự (2012) khi nhân nhanh thể chồi lan Hoàng thảo long nhãn (*Dendrobium*

fimbriatum) trong 8 tuần chỉ đạt 4,63 lần. Kết quả phân tích thống kê cũng cho thấy sự khác biệt về hệ số nhân thể chồi giữa các công thức thí nghiệm là có ý nghĩa (Sig < 0,05).

3.3. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng nhân nhanh chồi

Môi trường khoáng cơ bản cung cấp dinh dưỡng cho cây và có thể quyết định tới khả năng nhân nhanh chồi. Tuy vậy, mỗi loài cây sẽ thích hợp với mỗi loại môi trường khoáng nhất định. Trong thí nghiệm này, sử dụng 3 loại môi trường nuôi cấy với các môi trường khoáng cơ bản khác nhau (MS, WPM, Knops). Kết quả nghiên cứu được trình bày tại bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng nhân nhanh chồi (sau 6 tuần nuôi cấy)

CT TN	Môi trường dinh dưỡng	Tỷ lệ tạo cụm chồi (%)	Hệ số nhân chồi (lần)	Chất lượng chồi
D ₁	MS	77,1	7,6	Chồi mập, xanh lá
D ₂	Knops	71,4	7,1	Chồi mập, ít, xanh đậm
D ₃	WPM	72,2	6,9	Chồi mập, xanh đậm.
	Sig	0,0001	0,0001	

Kết quả cho thấy (Bảng 3), tỷ lệ tạo cụm chồi tương đối cao (71,4 đến 77,1%), số chồi trung bình/mẫu đạt giá trị 6,9 đến 7,6 chồi/mẫu. Trong đó, môi trường khoáng cơ bản MS có khả năng tái sinh chồi cao nhất với tỷ lệ tạo cụm chồi là 77,1%, đây là môi trường thích hợp cho tái sinh chồi. Chất lượng chồi nuôi cấy trên môi trường MS cũng khá tốt, phát triển nhanh và chồi mập, màu xanh đậm, số chồi nhiều (7,6 chồi/cụm). Kết quả trên có phần khiêm tốn hơn so với công bố của Vũ Kim Dung và cộng sự (2016), khi nhân nhanh Hoàng thảo ý thảo ba màu trên môi trường MS với kết quả là 100% mẫu tạo cụm chồi, nhưng hệ số nhân chỉ đạt 5,61 chồi/cụm. Theo công bố của Nguyễn Văn Việt (2016), khi nhân nhanh Hoàng thảo vôi trên môi trường MS cho kết quả là 87,6% mẫu tạo cụm chồi, số chồi trung bình đạt 5,6 chồi/cụm. Kết quả phân tích thống kê cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa tỷ lệ tái sinh chồi ở các môi trường cơ bản khác nhau là có ý nghĩa (Sig < 0,05).

3.4. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh chồi.

Việc bổ sung phối hợp Kinetin, BAP và NAA, làm cho hệ số nhân của chồi tăng lên rõ rệt. Các chất này thường được sử dụng để kích thích sự phân hóa, sinh trưởng và phát triển chồi của mẫu cấy *in vitro*. Tác dụng chủ yếu của chúng là kích thích sự phân chia mạnh mẽ của tế bào, đặc biệt ảnh hưởng rất lớn đến sự hình thành và phân hóa chồi (Nguyễn Văn Kết và cộng sự, 2010).

3.4.1. Ảnh hưởng của nồng độ BAP và NAA đến khả năng nhân nhanh chồi

Một số công trình nghiên cứu đã công bố về nhân giống chi lan *Dendrobium* của các tác giả, cho thấy chất điều hòa sinh trưởng BAP, NAA ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (Sana và cộng sự, 2011). Trong thí nghiệm này đã sử dụng môi trường khoáng cơ bản là MS bổ sung (0,2 đến 2,0 mg/l) BAP và 0,2 mg/l NAA. Kết quả được trình bày tại bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ BAP và NAA đến khả năng nhân nhanh chồi (sau 6 tuần nuôi cấy)

CT TN	Chất ĐHST (mg/l)		Tỷ lệ tạo cụm chồi (%)	Hệ số nhân chồi (lần)	Chất lượng chồi
	BAP	NAA			
ĐC	0	0	40,1	3,1	+
NC ₁	0,2	0,2	66,8	4,9	++
NC ₂	0,4	0,2	76,7	5,7	++
NC ₃	0,6	0,2	83,3	8,2	+++
NC ₄	0,8	0,2	86,7	9,4	+++
NC ₅	1,0	0,2	81,8	8,5	++
NC ₆	1,5	0,2	82,2	7,6	++
NC ₇	2,0	0,2	75,3	7,1	++
Sig			0,003	0,0012	

Ghi chú: +: Chồi mảnh, yếu, lá xanh; ++: Chồi thấp, gầy, yếu, lá xanh; +++: Chồi cao, mập, lá xanh đậm.

Kết quả tại bảng 3 cho thấy ở tất cả các công thức thí nghiệm có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi đều đạt giá trị cao (66,8 đến 86,7%), trong đó công thức thí nghiệm NC₄ (bổ sung 0,8 mg/l BAP, 0,2 mg/l NAA) cho kết quả tốt nhất, với tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi đạt 86,7%, số chồi TB/mẫu đạt 9,4 chồi, chất lượng chồi tốt, mập, đồng đều, màu xanh đậm. Kết quả trên tương ứng với công bố của Nguyễn Văn Việt (2016) khi nhân nhanh Hoàng thảo vôi trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BAP và 0,3 mg/l NAA, cho kết quả là

90% mẫu tạo cụm chồi, số chồi trung bình/mẫu đạt 9,6 chồi. Kết quả phân tích thống kê cho thấy sự khác biệt rõ rệt về khả năng nhân nhanh chồi giữa các công thức thí nghiệm (Sig < 0,05).

3.4.2. Ảnh hưởng của nồng độ BAP, Kinetin và NAA đến nhân nhanh chồi

Xác định ảnh hưởng của tổ hợp các chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh chồi, thí nghiệm được bố trí với môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung BAP, Kinetin và NAA có nồng độ khác nhau. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ BAP, Kinetin và NAA đến nhân nhanh chồi (sau 6 tuần nuôi cấy)

CT TN	Chất ĐHST (mg/l)			Tỷ lệ tạo cụm chồi (%)	Hệ số nhân chồi (lần)	Chất lượng chồi
	BAP	Kinetin	NAA			
ĐC	0	0	0	40,3	3,0	+
NN ₁	0,8	0,1	0,2	88,3	9,6	++
NN ₂	0,8	0,3	0,2	91,7	10,1	+++
NN ₃	0,8	0,5	0,2	96,8	13,7	+++
NN ₄	0,8	0,7	0,2	89,0	12,4	+++
NN ₅	0,8	0,9	0,2	86,3	9,6	++
NN ₆	0,8	1,1	0,2	84,5	8,9	++
NN ₇	0,8	1,5	0,2	81,7	8,2	++
Sig			0,0001	0,0001		

Ghi chú: +: Chồi mảnh, yếu, lá xanh; ++: Chồi thấp, gầy, yếu, lá xanh; +++: Chồi cao, mập, lá xanh đậm.

Kết quả ở bảng 5 cho thấy, khi bổ sung đồng thời BAP, NAA và Kinetin vào môi trường nuôi cấy, ở các công thức thí nghiệm cho tỷ lệ tạo cụm chồi đều cao. Với giá trị tỷ lệ tạo cụm chồi đạt 81,7% đến 96,8%, số chồi trung

bình/mẫu đạt từ 8,2 đến 13,3. Đặc biệt là công thức NN₃ đạt giá trị cao nhất, tỷ lệ tạo cụm chồi, số chồi trung bình của mỗi mẫu lần lượt là 96,8% và 13,3 chồi/cụm (Hình 1c, d, e). Kết quả trên tương ứng với kết quả nhân giống lan

Hoàng thảo vôi (Tỷ lệ tạo cụm chồi 96,7%, 12,3 chồi/cụm) của tác giả Nguyễn văn Việt (2017). Theo công bố của Vũ Kim Dung và cộng sự (2016) về nhân nhanh lan Hoàng thảo ý thảo ba màu cũng cho kết quả 96,67% tạo cụm chồi, số chồi tạo ra 9,53 chồi/cụm. Như vậy, có thể chọn môi trường nhân nhanh Phi Diệp tím Hoà Bình là môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung 0,8 mg/l BAP, 0,5 mg/l Kinetin và 0,2 mg/l NAA. Kết quả phân tích thống kê cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa các công thức thí nghiệm về hệ số nhân chồi ($Sig < 0,05$).

Bảng 6. Ảnh hưởng của nồng độ IBA và NAA tới khả năng ra rễ (sau 5 tuần nuôi cấy)

CT TN	Chất ĐHST (mg/l)		Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ trung bình/cây (rễ)	Chiều dài trung bình/rễ (cm)	Chỉ số ra rễ
	IBA	NAA				
ĐC	-	-	34,3	2,1	1,6	3,4
RR1	0,2	-	67,3	3,2	2,3	7,4
RR2	0,3	-	72,0	3,3	2,5	8,3
RR3	0,4	-	81,0	3,1	2,4	7,4
RR4	-	0,2	71,3	3,3	2,2	7,3
RR5	-	0,3	83,3	3,4	2,8	9,5
RR6	-	0,4	79,5	3,2	2,7	8,6
RR7	0,1	0,2	86,7	3,4	2,9	9,9
RR8	0,2	0,3	94,3	3,5	3,0	10,5
RR9	0,3	0,4	90,3	3,6	2,7	9,7
Sig			0,0023	0,0001	0,0001	

Kết quả tại bảng 6 cho thấy, ở các công thức thí nghiệm chỉ bổ sung một chất điều hoà sinh trưởng thực vật (IBA hoặc NAA) cho tỷ lệ ra rễ thấp. Môi trường bổ sung 0,2 đến 0,4 mg/l IBA, tỷ lệ ra rễ đạt 67,3 đến 81% và chỉ số ra rễ đạt 7,4 đến 8,3. Với các công thức môi trường bổ sung 0,2 đến 0,4 mg/l NAA, tỷ lệ ra rễ và chỉ số ra rễ cao nhất lần lượt là 83,3% và 9,5%. Các công thức môi trường bổ sung phối hợp hai chất ĐHST là (0,1 đến 0,3) mg/l IBA và (0,2 đến 0,4 mg/l) NAA, cho kết quả cao hơn so với bổ sung một trong hai chất trên, cụ thể là ở công thức RR₈, môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung 0,2 mg/l IBA và 0,3 mg/l NAA cho kết quả cao nhất về tỷ lệ chồi ra rễ và chỉ số ra rễ lần lượt là 94,3% và 10,5 (Hình 1f, 1h). Kết quả đạt được cũng tương tự

3.5. Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng ra rễ

Ra rễ tạo cây hoàn chỉnh *in vitro* là khâu quan trọng trước khi cho cây ra ngoài huấn luyện. Thí nghiệm được tiến hành với việc cấy chuyển chồi lan đủ tiêu chuẩn (chồi đạt 3 - 4 cm, mập, lá xanh) vào môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung (0,1 đến 0,4 mg/l) IBA, (0,2 đến 0,4 mg/l) NAA, 20 g/l sucrose, 6,5 g/l agar, 100 g/l khoai tây nghiền, 100 ml/l nước dừa. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 6.

như của tác giả Vũ Kim Dung và cộng sự (2016) đã dùng môi trường khoáng MS bổ sung NAA 0,3 mg/l, IBA 0,2 mg/l nghiên cứu ra rễ đối với lan Hoàng thảo ý thảo ba màu, tỷ lệ ra rễ đạt 93,33%. Tác giả Nguyễn Văn Việt (2017) đã nghiên cứu môi trường ra rễ đối với lan Hoàng thảo kèn trên môi trường khoáng cơ bản Knops bổ sung NAA 0,3 mg/l, IBA 0,1 mg/l cho tỷ lệ chồi ra rễ cao nhất đạt 100%, số rễ TB/cây 4,8 và chiều dài TB/rễ đạt 3,6 cm, chỉ số ra rễ 17,3. Kết quả phân tích thống kê cho thấy, nồng độ chất điều hoà sinh trưởng thực vật khác nhau ảnh hưởng rõ rệt tới khả năng ra rễ của Phi điệp tím Hoà Bình ($Sig < 0,05$).

3.6. Ảnh hưởng của thời gian huấn luyện đến tỷ lệ sống và chất lượng cây giống

Khi cây có chiều cao lớn hơn 4,5 cm, có khoảng 4 rễ, cây cứng cáp, tiến hành đem bình cây ra huấn luyện ở điều kiện ánh sáng tán xạ. Thí nghiệm này, được được bố trí với 4 công

thức khác nhau về thời gian, sau huấn luyện cây con được đem ra trồng trên giá thể hỗn hợp là dương xỉ và xơ dừa đã qua xử lý. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 7.

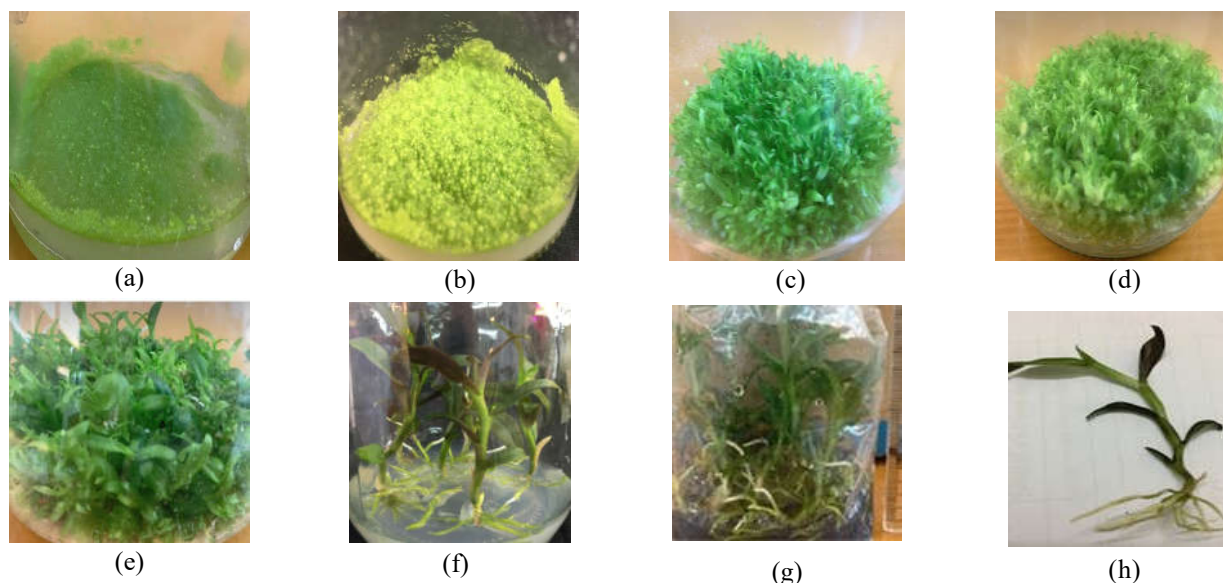
Bảng 7. Ảnh hưởng của thời gian huấn luyện đến tỷ lệ sống và chất lượng cây khi ra ngoài (sau 6 tuần ra ngoài)

CTTN	TG huấn luyện (ngày)	Số mẫu	Tỷ lệ sống (%)	Đặc điểm cây
ĐC	0	91	54,05	+
TG ₁	7	92	79,14	++
TG ₂	10	91	98,03	+++
TG ₃	14	91	97,70	+++
Sig			0,0025	

Ghi chú: +) Cây nhỏ, thân yếu, rễ bám giá thể kém; ++) Cây cao, lá xanh đậm, cây cứng cáp, rễ bám giá thể tốt; +++) Cây to, khỏe, lá xanh đậm, rễ bám giá thể tốt và xuất hiện rễ mới, tăng chiều cao cây.

Kết quả thu được (Bảng 7), cho thấy tỷ lệ sống ít có sai khác rõ rệt giữa công thức đối chứng (Không huấn luyện) với các công thức còn lại nhưng cây con có trải qua huấn luyện khả năng thích ứng với môi trường tự nhiên tốt

hơn. Thời gian huấn luyện 10 ngày, tỷ lệ sống của cây khi trồng ra giá thể đạt 98,03% (Hình 1g). Kết quả phân tích thống kê cho thấy, Sig < 0,05, chứng tỏ có sự khác biệt rõ rệt về tỷ lệ sống giữa các công thức thí nghiệm.



Hình 1. Hình ảnh cây lan Phi điệp tím Hòa Bình qua các giai đoạn nuôi cấy

Ghi chú: a) Tạo mẫu sạch và tái sinh thể chồi; b) Nhân nhanh thể chồi; c) Cụm chồi ở NN₂; d) Cụm chồi ở NN₃; e) Cụm chồi ở NN₄; f) Cây lan hoàn chỉnh ở RR₆; g) Cây lan đã huấn luyện; h) Cây lan hoàn chỉnh.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu nhân giống Phi điệp tím Hoà bình đã đạt được một số kết quả sau:

- Khử trùng mẫu bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 10 phút đạt tỷ lệ sạch 94,6%, tỷ lệ tạo thể chồi là 93,3%;

- Nhân nhanh chồi trên môi trường khoáng MS bổ sung 0,8 mg/l BAP, 0,2 mg/l NAA, 0,5 mg/l Kinetin, 30 g/l sucrose, 6,5 g/l agar, 100 g/l khoai tây nghiền, 100 ml/l nước dừa. Tỷ lệ tạo cụm chồi

là 96,8% và hệ số nhân chồi đạt 13,7 lần;

- Ra rễ - tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường khoáng MS bổ sung 0,2 mg/l IBA và 0,3 mg/l NAA, 100 mg/l khoai tây nghiền, 20 g/l sucrose, 6,5 g/l agar. Đạt tỷ lệ ra rễ 93,3%, số rễ trung bình là 3,5 rễ/cây, chiều dài rễ trung bình là 3,0 cm, chỉ số rễ 10,5;

- Huấn luyện 10 ngày dưới ánh sáng tán xạ, sau đó đưa cây ra trồng trên giá thể, tỷ lệ sống đạt 98,03% sau 6 tuần theo dõi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jaime A, Teixeira D.S, Jean C.C, Judit D, Songjun Z (2015). *Dendrobium* micropropagation a review. *Plant Cell Rep*, 34: 671- 704.

2. Lita S and Lestari S.P (2012). *In vitro* propagation of *Dendrobium* and phalaenopsis through tissue culture for conservation. *Agrivita*, 34 (2): 115-126.

3. Nguyễn Quỳnh Trang, Vũ Thị Huệ, Khuất Thị Hải Ninh, Nguyễn Thị Thơ (2013). Nhân giống *in vitro* lan Phi điệp tím (*Dendrobium anosmum*). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, 3 (1): 16-21.

4. Nguyễn Thị Sơn, Nguyễn Thị Lý Anh, Vũ Ngọc Lan, Trần Thế Mai (2012). Nhân giống *in vitro* loài lan Hoàng thảo long nhãn (*Dendrobium fimbriatum*). *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 2 (10): 263-271.

5. Nguyễn Văn Kết và Nguyễn Văn Vinh (2010). Nghiên cứu khả năng nhân giống loài Lan Hoàng thảo sấp (*Dendrobium crepidatum*) *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 48 (5): 89 – 95.

6. Nguyễn Văn Việt, Bùi Văn Thắng, Nguyễn Thị Hương, Nguyễn Thị Thu Hằng (2016). Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* trong nhân giống Quế lan hương (*Aerides odorata*). *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Lâm*

ng nghiệp, 6: 162-169.

7. Nguyễn Văn Việt (2017). Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* trong nhân giống lan Hoàng thảo vôi (*Dendrobium cretaceum*). *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 6 (79): 55-58.

8. Nguyễn Văn Việt (2017). Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* trong nhân giống lan Hoàng thảo kèn (*Dendrobium lituiflorum*). *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Lâm nghiệp*, 4: 39-45.

9. Sana A, Touqeer A, Ishfaq A.H, Mehwish (2011). *In vitro* propagation of Orchid (*Dendrobium nobile*) var, Emma white. *African Journal of Biotechnology*, 10 (16): 3097-3103.

10. Trần Văn Minh và Nguyễn Văn Uyên (2001). Vi nhân giống phong lan nhóm *Dendrobium* trên quy mô công nghiệp. *Tạp chí Khoa học Công nghệ*, 1: 1-9.

11. Vũ Kim Dung, Nguyễn Văn Việt, Bùi Văn Thắng (2016). Nhân giống lan Hoàng thảo ý thảo ba màu (*Dendrobium gratiosissimum*) bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, 6: 156-161.

12. Vũ Ngọc Lan và Nguyễn Thị Lý Anh (2013). Nhân giống *in vitro* loài lan bản địa *Dendrobium nobile*. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 11 (7): 917-925.

USING *IN VITRO* CULTURE TECHNIQUE IN PROPAGATION OF *Dendrobium anosmum* Lindley

Do Quynh Lien¹, Doan Thi Thu Huong¹, Nguyen Van Viet¹, Vu Tien Hung¹
¹*Vietnam National University of Forestry*

SUMMARY

Dendrobium anosmum Lindley is a valuable orchid, high economic value, flowers grow into drops, with many small purple flowers and a pleasant scent. Micropropagation of *Dendrobium anosmum* by *in vitro* cultural technique has been successfully studied. The results showed that the optimal method for bud sterilization was soaked in ethanol 70% for 2 minutes, by HgCl₂ 0.1% solution for 10 minutes and then culturing the sample with MS medium provided the proportion of reached survival rate was 94.6% and the protocorm rate was 93.3% after 23 dates being cultured. Forming multi-buds induction in MS medium with 6-benzylaminopurine (BAP) 0.8 mg/l, Kinetin 0.5 mg/l, α -naphthaleneacetic acid (NAA) 0.2 mg/l, coconut water 100 ml/l, potatoes extract 100 ml/l, sucrose 30g/l, the buds developed rapidly and were green, the coefficient of formed buds was highest (13.7 time) after 6 weeks. The rooted shoots 94.3% the average number of roots was 3.5 per individual and the average length of roots was 3.0 cm when cultured in MS medium supplemented with IBA 0.2 mg/l, NAA 0.3 mg/l, and potatoes 100 g/l, sucrose 20 g/l after 5 weeks. Shoots which had more than 4 cm height and about 3 to 4 roots can be trained outside in nature 10 days and then will be washed agar and be transplanted into suitable bases, survival rate was 98.03% after 6 weeks.

Keywords: *Dendrobium anosmum* Lindley, *in vitro*, knops, micropropagation, protocorm.

Ngày nhận bài : 16/9/2019
Ngày phản biện : 18/10/2019
Ngày quyết định đăng : 25/10/2019