

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG *IN VITRO* LAN PHI ĐIỆP TÍM (*DENDROBIUM ANOSMUM* LINDL.) TỪ MÁT NGỦ Ở THÂN

Vi Thị Xuân Thủy^{1*}, Phạm Hồng Sơn¹, Trần Thị Mừng¹,
Trần Thị Hồng Xuân¹, Phạm Hoàng Đan¹, Hà Đăng Chiến²

¹Trường Đại học Tây Bắc;

²Trường Đại học Sư Phạm Hà Nội 2

Tóm tắt: Thân lan Phi điệp tím (*Dendrobium anosmum* Lindl.) chứa mắt ngủ khỏe mạnh, không sâu, bệnh được khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 9 phút kép (7 phút lần 1 và 2 phút lần 2) đạt tỷ lệ mẫu sống, sạch cao nhất (47,86%). Mẫu được nuôi trên môi trường MS bổ sung BAP 1,5 mg/l là thích hợp cho quá trình tái sinh chồi từ mẫu cây với tỷ lệ tái sinh chồi đạt 72,58%, chồi mập mập, màu xanh đậm. Môi trường MS bổ sung BAP 1,5 mg/l và α -NAA 0,5mg/l là thích hợp cho tạo đa chồi với tỷ lệ tạo cụm chồi đạt 86,74% và số chồi là 8,33 chồi/mẫu, chồi mập, lá màu xanh đậm. Chồi lan Phi điệp tím sinh trưởng tốt nhất môi trường MS bổ sung 15% nước dừa. Môi trường thích hợp cho quá trình ra rễ tạo cây lan Phi điệp tím hoàn chỉnh là MS bổ sung α -NAA 0,7 mg/l với số rễ/ chồi là 8,36, chiều dài rễ 5,03 cm, thân cây cao 2,84 cm sau 8 tuần nuôi cấy. Kết quả trong nghiên cứu này là cơ sở nhân giống *in vitro* lan Phi điệp tím, để góp phần bảo vệ, phát triển nguồn gen và có thể thương mại hóa loài lan rừng quý này.

Từ khóa: *Dendrobium anosmum* Lindl., BAP, *in vitro*, MS, α -NAA

1. MỞ ĐẦU

Lan rừng ở nước ta phong phú, đa dạng với nhiều chủng loại do có điều kiện khí hậu thích hợp. Lan hoàng thảo (*Dendrobium*) là một chi lớn trong [Họ Lan](#) (Orchidaceae) bao gồm hơn 1.200 loài, được phân bố rộng rãi nhiều ở [Nam Á](#), [Đông Á](#) và [Đông Nam Á](#) [2]. Ở nước ta, *Dendrobium* có 107 loài đã được xác định, với đặc điểm hoa đẹp, màu khảm, tạo nên một tổ hợp và màu sắc rất phong phú, đáng thân công buồng thống, chu kỳ ra hoa ngắn. Hơn nữa hoa có hương thơm, lâu tàn, chùm hoa nở kéo dài từ 1 - 2 tháng mới hết hoa nên rất được khách hàng ưa chuộng trong làm cảnh và nhiều loài có giá trị làm thuốc [6]. Phi điệp tím (*Dendrobium anosmum* Lindl.) là một loài [lan](#) trong chi [lan Hoàng thảo](#) (*Dendrobium*) [1].

Hạt phong lan muốn nảy mầm được thì cần có nấm đặc hiệu cộng sinh nên khả năng nảy mầm trong tự nhiên là rất thấp bởi hạt phong lan không có nội nhũ hoặc có lớp nội nhũ rất mỏng [11, 15]. Hơn nữa quả lan rất dễ bị tổn

thương dưới tác động của các điều kiện stress phi sinh học. Cùng với sự xuống cấp của một loạt các hệ sinh thái đã làm cho môi trường sống của phong lan ngày càng bị thu hẹp, các khu rừng đặc dụng diện tích ngày càng giảm do nhiều nguyên nhân. Trong thời gian gần đây, người dân khai thác quá mức để thương mại là nguyên nhân hàng đầu khiến các loài phong lan nếu không được bảo tồn kịp thời sẽ rơi vào nguy cơ bị tuyệt chủng.

Nhân giống phong lan bằng phương pháp truyền thống (nhân từ hom thân, tách bụi,...) thời gian dài, hệ số nhân thấp và ảnh hưởng lớn đến cây mẹ [13]. Kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* là phương pháp được sử dụng trong nhân giống các cây trồng có giá trị với khả năng tạo ra số lượng lớn trong thời gian ngắn với chi phí thấp, tỷ lệ cây sống cao [9]. Đã có nhiều tác giả nghiên cứu nhân giống *in vitro* thành công một số loài lan thuộc chi *Dendrobium*: Hoàng thảo sấp (*Dendrobium Crepidatum* Lindl. & Paxt.), Thạch斛 Thiết bì (*Dendrobium Dendrobium officinale* Kimura et Migo) - một loài có giá trị

làm thuốc quý, Hoàng thảo kền (*Dendrobium lituiflorum* Lindl.), Hoàng thảo nghệ tâm (*Dendrobium loddigesii* Rolfe) [7, 16, 19, 8].

Nguyễn Thu Hằng (2016), Nguyễn Quỳnh Trang và cs (2013), Đặng Thu Hà và cs (2020) đã nhân giống *in vitro* lan Phi điệp tím (*Dendrobium anosmum*) từ hạt thành công [6, 17, 3]. Tuy nhiên, nhược điểm của nhân giống hoa lan từ hạt là không giữ được các đặc tính của cây mẹ, mặt hoa có thể bị sai khác do biến dị tổ hợp và thời gian ra hoa rất dài [18]. Trong khi nhân giống *in vitro* từ cơ quan sinh dưỡng thì cây con sinh ra có đặc điểm giống cây mẹ, mặt hoa không có sự sai khác. Chính vì vậy, nghiên cứu nhân giống *in vitro* lan Phi điệp tím (*Dendrobium anosmum* Lindl.) từ mắt ngủ ở thân để góp phần bảo vệ, phát triển nguồn gen và có thể thương mại hóa loài lan rừng quý này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, thời gian, địa điểm nghiên cứu

Thân lan Phi điệp tím (*Dendrobium anosmum* Lindl.) chứa mắt ngủ khỏe mạnh, không sâu, bệnh thu thập ở vườn lan ở thành phố Sơn La được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu.

Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 09 năm 2020 đến tháng 06 năm 2021 trại trung tâm Thực hành- Thí nghiệm, trường Đại học Tây Bắc.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Môi trường và điều kiện nuôi cấy: Môi trường sử dụng trong nghiên cứu là MS [14] bổ sung saccharose 20 g/l + agar 8 g/l, pH môi trường 5,8. Tùy theo mục đích của các thí nghiệm mà bổ sung độc lập hay phối hợp các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau. Thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 2500 lux, nhiệt độ $22 \pm 2^\circ\text{C}$ và độ ẩm không khí 75 - 85%.

Khử trùng mẫu tạo vật liệu khởi đầu in vitro: Thân lan Phi điệp tím sau khi thu hái được phơi nắng 3-5 ngày sau đó rửa sạch dưới vòi nước chảy. Tiếp theo ngâm trong cồn 70° trong 2 phút, rửa lại nhiều lần với nước cất vô

trùng. Sử dụng dung dịch HgCl_2 0,1% để khử trùng thân lan trong 3, 5, 7, 9 và 11 phút sau đó rửa lại 3 lần trong nước cất vô trùng. Sau khi khử trùng, dùng dao cắt đoạn thân chứa mắt ngủ cấy lên môi trường MS. Khử trùng kép: Mẫu được xử lý trong dung dịch HgCl_2 0,1% trong thời gian xác định, được rửa lại nhiều lần trong nước cất vô trùng sau đó tiếp tục xử lý mẫu trong dung dịch HgCl_2 0,1% lần 2. Thí nghiệm mỗi công thức ≥ 30 bình, 01 mẫu cây/bình, lặp lại 3 lần. Các chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ mẫu nhiễm (%), tỷ lệ mẫu sạch tái sinh (%), tỷ lệ mẫu sạch bị chết (%).

Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng tái sinh chồi: Sử dụng môi trường MS bổ sung Benzylaminopurine (BAP) với nồng độ khác nhau (0,0 – 2,0 mg/l) để khảo sát ảnh hưởng đến khả năng tái sinh chồi. Thí nghiệm ≥ 30 bình/công thức, 01 mẫu cây/bình, lặp lại 3 lần. Các chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ chồi tái sinh (%), chất lượng chồi.

Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ BAP và α -NAA đến khả năng tạo đa chồi: Nghiên cứu tiến hành trên môi trường MS có bổ sung BAP với nồng độ là 1,5 mg/l và bổ sung α -naphthaleneacetic acid (α -NAA) với các nồng độ khác nhau (0,0 – 0,7 mg/l). Thí nghiệm ≥ 30 bình/công thức, 20 chồi/ bình. Các chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi (%), số chồi/ mẫu, chất lượng chồi.

Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của nước dừa lên khả năng sinh trưởng chồi: Chồi lan Phi điệp tím cao 0,5 cm được nuôi trên môi trường MS bổ sung nước dừa với tỷ lệ khác nhau (0 – 20%) để khảo sát sự tác động của nước dừa lên khả năng sinh trưởng của chồi lan. Thí nghiệm ≥ 30 bình/công thức, 20 chồi/ bình. Các chỉ tiêu đánh giá: chiều cao cây (cm), số lá/cây, chất lượng chồi.

Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ α -NAA đến khả năng tạo rễ: Chồi sau khi được nhân với số lượng lớn được cấy trên môi trường MS có bổ sung α -NAA với nồng độ khác nhau (0,0 – 0,9 mg/l) để khảo sát khả năng tạo rễ của chồi. Thí nghiệm ≥ 30 bình/công thức,

20 chồi/ bình. Các chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ ra rễ (%), số rễ/chồi, chiều dài rễ (cm), chất lượng rễ.

Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê bằng phần mềm IRRISTAT 5.0 và phần mềm Excel 2007.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khử trùng mẫu tạo vật liệu khởi đầu *in vitro*

Bước quan trọng có ý nghĩa quyết định đến sự thành công của cả quy trình trong nhân giống *in vitro* là tạo được nguồn vật liệu khởi

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian xử lý HgCl₂ 0,1% đến khả năng tạo mẫu sạch Phi điệp tím sau 30 ngày nuôi cấy

Thời gian xử lý HgCl ₂ 0,1%	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	
		Tỷ lệ mẫu sống tạo cây	Tỷ lệ mẫu chết
3 phút	100 ^a	0 ^f	0 ^f
5 phút	83,17 ^b	12,51 ^e	4,32 ^e
7 phút	62,67 ^c	25,00 ^d	11,34 ^d
9 phút	40,06 ^d	34,41 ^c	25,53 ^c
9 phút kép (7 phút lần 1, 2 phút lần 2)	39,17 ^d	47,86 ^a	12,97 ^d
11 phút	30,65 ^e	33,34 ^c	36,01 ^a
11 phút kép (9 phút lần 1, 2 phút lần 2)	29,28 ^e	41,18 ^b	29,54 ^b

Các chữ cái khác nhau trong cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test).

Qua bảng 1 cho thấy, khi tăng thời gian ngâm mẫu từ 3 phút lên 11 phút kép thì lượng mẫu nhiễm giảm rõ rệt từ 100% xuống 29,28%, điều này chứng tỏ HgCl₂ 0,1% có tác dụng khử trùng thân lan Phi điệp tốt. Thời gian xử lý HgCl₂ 0,1% ảnh hưởng đến sức sống của mẫu tỷ lệ mẫu chết tăng từ 4,32% khi xử lý ở 5 phút lên 36,01% ở 11 phút đơn. Khi khử trùng mẫu ở 9 phút đơn và kép (7 phút lần 1 và 2 phút lần 2) thì tỷ lệ mẫu nhiễm lần lượt là 30,65% và 29,28% hai giá trị này không có ý nghĩa sai khác thống kê với $p < 0,05$, nhưng tỷ lệ sống khác nhau rõ rệt ở 9 phút đơn là 34,41 % trong khi đó ở 9 phút kép tăng lên 47,86% và đạt tỷ lệ mẫu sạch, sống cao nhất trong các công thức thí nghiệm. Có thể thấy sử dụng HgCl₂ 0,1% kép có hiệu quả hơn hẳn khử trùng đơn, ít ảnh

hưởng đến sức sống của mẫu. Như vậy, khử trùng thân lan Phi điệp tím mang mắt ngủ bằng HgCl₂ 0,1% để tỷ lệ mẫu nhiễm thấp (39,17%), tỷ lệ mẫu sống cao (47,86%) ở 9 phút kép (7 phút lần 1 và 2 phút lần 2) là tốt nhất.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến

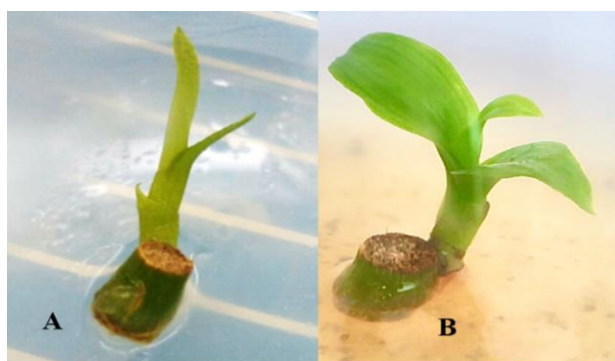
khả năng tái sinh chồi

Sự sinh trưởng của mẫu trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật, phụ thuộc rất nhiều vào môi trường nuôi cấy và các chất điều hòa sinh trưởng. BAP là một loại cytokinin có vai trò quan trọng trong phân chia tế bào và kích thích sự hình thành chồi [2]. BAP được sử dụng để nghiên cứu đến khả năng tái sinh chồi lan Phi điệp tím trong nuôi cấy khởi động. Chồi lan Phi điệp tím sau 6 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 2 và hình 1.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng tái sinh chồi lan Phi điệp tím sau 6 tuần nuôi cấy

Nồng độ BAP (mg/l)	Tỷ lệ chồi tái sinh (%)	Chất lượng chồi
0,0	28,28 ^d	Chồi nhỏ, màu xanh nhạt
0,5	42,5 ^c	Chồi nhỏ, màu xanh
1,0	69,83 ^b	Chồi trung bình, màu xanh đậm
1,5	72,58 ^b	Chồi mập, màu xanh đậm
2,0	81,23 ^a	Chồi trung bình, màu xanh đậm

Các chữ cái khác nhau trong cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test).



Hình 1. Hình ảnh chồi lan Phi điệp tái sinh sau 4 tuần (A) và 6 tuần (B) nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung BAP 1,5 mg/l

Kết quả bảng 2 cho thấy, BAP có ảnh hưởng tốt đến khả năng tái sinh chồi của mô nuôi cấy. Khi bổ sung BAP với nồng độ tăng dần từ 0,5 đến 2 mg/l thì khả năng tái sinh chồi cũng tăng. Ở nồng độ BAP 1,0 mg/l đạt tỷ lệ tái sinh chồi 69,83% và ở nồng độ BAP 1,5 mg/l đạt tỷ lệ tái sinh 72,58% hai giá trị này không có ý nghĩa sai khác thống kê với $p < 0,05$. Nhưng chất lượng chồi lại khác nhau, trên môi trường bổ sung BAP 1,0 mg/l chồi có kích thước trung bình, màu xanh đậm, trong khi mẫu nuôi trên môi trường bổ sung BAP 1,5 mg/l chồi sinh trưởng tốt, mập mạp, có màu xanh thẫm. Khi tăng BAP lên 2 mg/l thì khả năng tái sinh chồi tăng lên 81,23% nhưng chất lượng chồi có xu hướng giảm, kích thước chồi trung bình và màu xanh. Vì vậy, môi trường có bổ sung BAP 1,5 mg/l là tốt nhất cho tái sinh chồi lan Phi điệp tím và được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của nồng độ α -NAA và BAP đến khả năng tạo đa chồi

Chất, tỷ lệ chất điều hòa sinh trưởng thích hợp là một trong những yếu tố quan trọng quyết định sự thành công giai đoạn tạo đa chồi *in vitro*. Đặc biệt là tỷ lệ giữa hai nhóm chất điều hòa sinh trưởng auxin và cytokinin liên quan đến khả năng biệt hóa chồi thường xuyên. Sự kết hợp giữa hai nhóm chất này ở nồng độ thích hợp có hiệu quả cao trong việc nhân nhanh chồi và tăng chất lượng chồi [10, 11]. Do đó, ảnh hưởng của nồng độ BAP và α -NAA lên khả năng tạo đa chồi của lan Phi điệp tím được nghiên cứu.

Chồi lan Phi điệp tím sau khi được nuôi cấy khởi động được chuyển sang môi trường MS bổ sung phối hợp BAP và α -NAA để nghiên cứu ảnh hưởng tới khả năng tạo đa chồi. Chồi lan Phi điệp tím sau 8 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 3, hình 2.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ BAP và α -NAA đến khả năng tạo đa chồi lan Phi điệp sau 8 tuần nuôi cấy

BAP (mg/l)	α -NAA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chất lượng chồi
1,5	0,0	18,62 ^b	1,67 ^c	Chồi mập, lá màu xanh đậm
1,5	0,1	79,23 ^a	3,83 ^d	Chồi mập, lá màu xanh đậm
1,5	0,3	83,68 ^a	6,45 ^c	Chồi mập, lá màu xanh đậm
1,5	0,5	86,74 ^a	8,33 ^b	Chồi mập, lá màu xanh đậm
1,5	0,7	88,13 ^a	11,34 ^a	Chồi trung bình, lá màu xanh nhạt

Các chữ cái khác nhau trong cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test).

Kết quả ở bảng 3 và hình 2 cho thấy, môi trường chỉ có bổ sung BAP 1,5 mg/ml tỷ lệ tạo cụm chồi của lan Phi điệp tím đạt chỉ đạt 18,62%. Nhưng khi bổ sung thêm α -NAA với các nồng độ khác nhau thì tỷ lệ tạo cụm chồi của các tổ hợp chất tăng lên, đạt 79,23 đến 88,13%. Tuy nhiên tỷ lệ tạo cụm chồi không khác biệt thống kê giữa các công thức bổ sung cả BAP và α -NAA. Nhưng chúng ảnh hưởng rõ rệt lên khả năng biệt hóa tạo đa chồi của lan Phi điệp tím. Ở công thức thí nghiệm chỉ bổ sung BAP 1,5 mg/ml số chồi/mẫu đạt 1,67 chồi. Nhưng khi bổ sung thêm α -NAA với nồng độ 0,1 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,5 mg/ml và 0,7 mg/l thì số chồi/ mẫu đạt lần lượt là 3,83 chồi, 6,45 chồi, 8,33 chồi và 11,34 chồi. Ở công thức bổ sung BAP 1,5 mg/l + α -NAA 0,7 mg/ml đạt tỷ lệ tạo cụm chồi và số chồi/mẫu là cao nhất, nhưng chất lượng chồi ở công thức này lại thấp hơn các công thức thí nghiệm

khác. Chính vì vậy, trong các thí nghiệm nghiên cứu thì công thức bổ sung BAP 1,5 mg/l + α -NAA 0,5 mg/ml là tốt nhất cho tạo đa chồi ở lan Phi điệp tím. Kết quả này cho thấy, khả năng biệt hóa liên tục tạo chồi của mô nuôi cấy không những phụ thuộc vào chất điều hòa sinh trưởng mà còn phụ thuộc vào tỷ lệ nhóm chất auxin/cytokinin.

3.4. Ảnh hưởng của nước dừa lên sinh trưởng chồi

Nước dừa có có tác dụng trong việc kích thích phân bào và kích thích sự phát triển ở một số thực vật bởi chúng chứa nhiều chất dinh dưỡng khác nhau bao gồm amino acid, đường, khoáng chất và các phytohormon, ethylene, ABA, phenol... [11]. Chồi lan Phi điệp tím có chiều cao 0,5 cm được chuyển sang môi trường MS có bổ sung nước dừa với nồng độ khác nhau (0, 5, 10, 15, 20 %) để khảo sát sự tác động của nước dừa lên khả năng sinh trưởng của chồi. Chồi lan Phi điệp tím 06 tuần nuôi cấy kết quả được trình bày ở bảng 4 và hình 3.



Hình 2. Hình ảnh tạo đa chồi lan Phi điệp tím nuôi trên môi trường MS bổ sung BAP và α -NAA với các nồng độ khác nhau sau 8 tuần nuôi cấy

(A: BAP 1,5 mg/l + α -NAA 0,0 mg/ml; B: BAP 1,5 mg/l + α -NAA 0,1 mg/ml; C: BAP 1,5 mg/l + α -NAA 0,3 mg/ml; D: BAP 1,5 mg/l + α -NAA 0,5 mg/ml; E: BAP 1,5 mg/l + α -NAA 0,7 mg/ml)

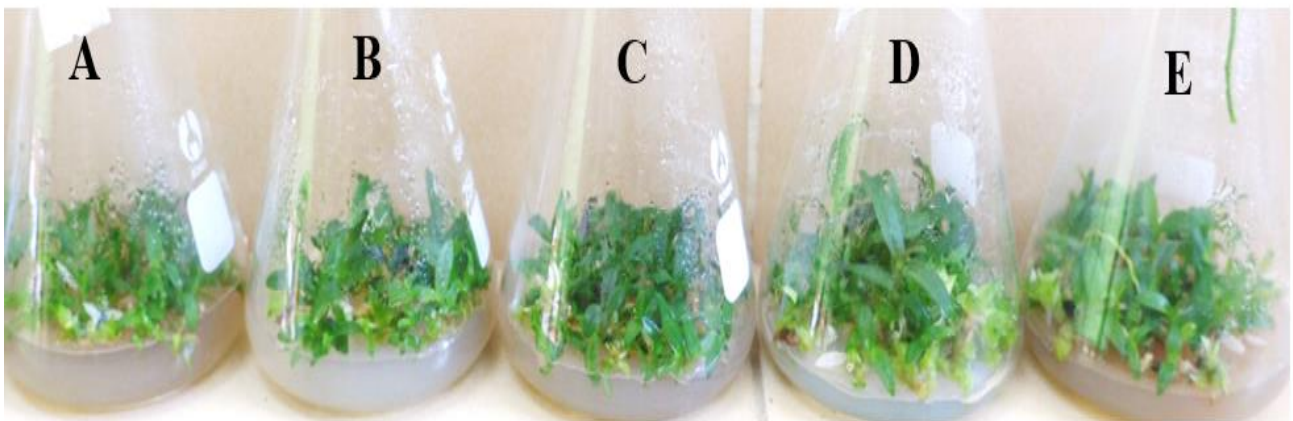
Bảng 4. Ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa lên sinh trưởng của chồi lan Phi điệp tím sau 6 tuần nuôi cấy

Nồng độ nước dừa (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lượng lá/cây	Chất lượng chồi
0	1,05 ^d	2,28 ^c	Chồi nhỏ, lá màu xanh đậm
5	1,77 ^c	3,36 ^b	Chồi trung bình, lá màu xanh
10	1,92 ^{bc}	3,43 ^b	Chồi mập, lá màu xanh đậm
15	2,15 ^a	4,12 ^a	Chồi mập, lá màu xanh đậm
20	2,12 ^{ab}	3,56 ^a	Chồi trung bình, lá màu xanh đậm

Các chữ cái khác nhau trong cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test).

Kết quả nghiên cứu bảng 4 và hình 3 cho thấy nước dừa có tác tới sinh trưởng của chồi lan Phi điệp tím. Chồi được nuôi trên môi trường MS không bổ sung nước dừa (đối chứng), chiều cao trung bình của cây sau 06 tuần nuôi cấy đạt 1,05 cm có 2,28 lá, chồi nhỏ, lá màu xanh đậm. Chồi được nuôi trên các môi trường MS có bổ sung nước dừa với hàm lượng khác nhau thì cây trưởng sinh tăng rõ rệt. Trên môi trường MS bổ sung nước dừa 5%, chiều cao trung bình các cây đạt 1,77 cm với 3,36 lá và chồi kích thước trung bình, lá màu xanh

đậm. Khi tăng nước dừa lên 15% cho thấy cây sinh trưởng tốt nhất với chiều cao đạt 2,15 cm số lá đạt được 4,12 lá và chồi mập mập, lá màu xanh đậm. Khi tăng hàm lượng nước dừa lên 20% thì cây sinh trưởng có xu hướng yếu đi, chiều cao cây chỉ đạt 2,12 cm với 3,56 lá. Kết quả nghiên cứu của Phan Xuân Huyền và cs (2015), khi nghiên cứu ảnh hưởng của nước dừa tới sinh trưởng của cây hoa lan *Miltonia* sp *in vitro* cũng cho kết quả môi trường bổ sung 15% nước dừa là tốt nhất cho sinh trưởng của cây [5].



Hình 3. Hình ảnh chồi lan Phi điệp tím được nuôi trên MS bổ sung nước dừa với các nồng độ khác nhau sau 6 tuần nuôi cấy

(A: MS + 0% nước dừa; B: MS + 5% nước dừa; C: MS + 10% nước dừa; D: MS + 15% nước dừa; E: MS + 20% nước dừa)

3.5. Ảnh hưởng của nồng độ α -NAA đến khả năng tạo rễ

Giai đoạn ra rễ để tạo cây hoàn chỉnh là một giai đoạn quan trọng, góp phần thành công trong quy trình nhân giống *in vitro*. Trong giai đoạn này chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm auxin có vai trò quan trọng. Bởi auxin có tác

dụng kích thích sự phân hóa rễ ở nồng độ thích hợp [10]. α -NAA là chất thuộc nhóm auxin được sử dụng phổ biến trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật [9]. Ảnh hưởng của α -NAA tới hình thành rễ của lan Phi điệp tím đã được khảo sát, sau 8 tuần nuôi cấy kết quả được thể hiện ở bảng 5 và hình 4.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ α -NAA lên sự tạo rễ của chồi lan Phi điệp tím sau 8 tuần nuôi cấy

Nồng độ α -NAA (mg/l)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)	Chiều cao cây (cm)
0,0	93 ^a	3,19 ^d	2,33 ^d	1,12 ^d
0,3	100 ^a	4,64 ^c	3,62 ^c	1,94 ^c
0,5	100 ^a	5,93 ^c	3,27 ^c	2,01 ^{bc}
0,7	100 ^a	8,36 ^a	5,03 ^a	2,84 ^a
0,9	100 ^a	7,02 ^b	4,81 ^b	2,42 ^b

Các chữ cái khác nhau trong cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test).

Kết quả nghiên cứu ở bảng 5 và hình 4 cho thấy, môi trường nuôi cấy không bổ sung α -NAA rễ lan Phi điệp tím vẫn được hình thành. Điều này chứng tỏ auxin nội sinh được hình thành ở chồi và di vận chuyển xuống gốc để cảm ứng tạo rễ. Tuy nhiên, số lượng rễ, chiều dài rễ và chiều cao thân cây có sự khác nhau giữa các môi trường bổ sung nồng độ α -NAA khác nhau. Trên môi trường MS không bổ sung α -NAA (đối chứng), chồi lan Phi điệp tím có số rễ/chồi đạt 3,19, chiều dài 2,33 cm với chiều cao thân đạt 1,12 cm. Khi tăng nồng độ α -NAA từ 0,3 – 0,7 mg/l thì số lượng rễ/ chồi, chiều dài rễ, chiều cao thân đều tăng. Ở môi trường bổ sung α -NAA ở nồng độ 0,7 mg/l cho số lượng rễ/chồi hình thành cao nhất 8,36 cao gấp 2,62 lần đối chứng, chiều dài rễ đạt 5,03 cm, chiều cao cây 2,84 cm cao gấp 2,53 lần đối chứng. Khi tăng nồng độ α -NAA lên 0,9 mg/l thì số lượng rễ/chồi giảm còn 7,02 và chiều dài

chỉ đạt 4,81 cm (Hình 4) với chiều cao cây 2,42 cm. Có thể thấy, nồng độ α -NAA cao có hiện tượng ức chế phát sinh rễ, có thể do auxin ở nồng độ cao sẽ kích thích sự tạo sơ khởi rễ nhưng sẽ cản trở sự tăng trưởng của các sơ khởi này [12]. Như vậy, môi trường bổ sung α -NAA 0,7 mg/l là cảm ứng ra rễ chồi *in vitro* lan Phi điệp tím tốt nhất. Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Sơn và cs (2014), Phan Xuyên Huyền và cs (2015) và Phan Thị Thu Hiền và cs (2017) cũng chỉ ra rằng α -NAA có ảnh hưởng tích cực tới phát sinh rễ của lan Thạch斛 thiết bì (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo.), lan *Miltonia* sp. và lan Đại châu đỏ (*Rhynchostylis gigantea* L.). Tuy nhiên các loài khác nhau thì nồng độ phù hợp khác nhau với Thạch斛 thiết bì nồng độ α -NAA tối ưu là 0,5 mg/l, lan *Miltonia* sp. 0,1-1,0 mg/l còn Đại châu đỏ là 1,5 mg/l [16, 5, 4].



Hình 4. Hình ảnh rễ hình thành từ chồi lan Phi điệp tím trên môi trường bổ sung α -NAA nồng độ khác nhau

(A: MS + α -NAA 0 mg/l; B: MS + α -NAA 0,3 mg/l; C: MS + α -NAA 0,5 mg/l; D: MS + α -NAA 0,7 mg/l; E: MS + α -NAA) 0,9 mg/l)

KẾT LUẬN

Quy trình nhân *in vitro* lan Phi điệp tím từ mắt ngủ ở thân gồm 5 bước như sau:

Bước 1: Khử trùng thân chứa mắt ngủ lan Phi điệp tím ở 9 phút kép (7 phút lần 1 và 2 phút lần 2) trong HgCl₂ 0,1% (đạt tỷ lệ mẫu sống, sạch 47,86%).

Bước 2. Tái sinh chồi từ mẫu cấy trên môi trường MS bổ sung BAP 1,5 mg/l là thích hợp nhất với tỷ lệ tái sinh chồi đạt 72,58%, chồi mập mạp, màu xanh đậm.

Bước 3. Môi trường MS bổ sung BAP 1,5 mg/l và α -NAA 0,5mg/l là thích hợp cho tạo đa chồi Phi điệp tím với tỷ lệ tạo cụm chồi đạt 86,74% và số chồi cao nhất đạt 8,33 chồi/mẫu và chồi mập, lá màu xanh đậm.

Bước 4. Sinh trưởng chồi lan Phi điệp tím trên môi trường MS chứa 15% nước dừa là tốt nhất với chiều cao chồi đạt 2,15 cm và 4,12 lá/cây, chồi mập, lá màu xanh đậm.

Bước 5. Chồi được cấy trên môi trường MS bổ sung α -NAA 0,7 mg/l là thích hợp nhất cho quá trình ra rễ, tạo cây lan Phi điệp tím hoàn chỉnh với số rễ/ chồi là 8,36, rễ đạt chiều dài 5,03 cm, thân cây cao 2,84 cm sau 8 tuần nuôi cấy.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ từ nguồn kinh phí Khoa học và Công nghệ của Trường Đại học Tây Bắc cho đề tài mã số: Mã số: TB 2021-41.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyễn Tiến Bản (chủ biên) (2005), *Danh lục các loài thực vật Việt Nam, Tập III*, Nxb Nông nghiệp Hà Nội.
- [2]. Givnish TJ, Spalink D, Ames M, Lyon SP, Hunter SJ, Zuluaga A, Iles WJD, Clements MA, Arroyo MTK, Leebens-Mack J, Endara L, Kriebel R, Neubig KM, Whitten WM, Williams NH, Cameron KM (2015), "Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification", *Proceedings of the Royal Society B* 282 (1814) 1553.
- [3] Đặng Thị Thu Hà, Phạm Thu Hà (2020) "Nghiên cứu nhân giống lan phi điệp tím (*Dendrobium anosmum* Lindl.) bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*", *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 14, tr: 101-109.
- [4]. Phan Thị Thu Hiền, Nguyễn Văn Đỉnh (2017), "Nhân giống lan Đại châu đồ (*Rhynchostylis gigantea* L.) bằng công nghệ nuôi cấy *in vitro*", *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN*, 33, (1), tr: 48-57.
- [5]. Phan Xuân Huyền, Hoàng Văn Cường, Nguyễn Thị Phương Hoàng (2015), "Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây hoa lan *Miltonia* sp.", *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 13 (7), tr: 1128-1135.
- [6]. Nguyễn Thu Hường (2016), Nghiên cứu nhân giống *in vitro* lan Hoàng thảo Phi điệp tím (*Dendrobium asomum* Lindl.), *Luận văn thạc sĩ Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên*.
- [7]. Nguyễn Văn Kết, Nguyễn Văn Vinh (2010), "Nghiên cứu khả năng nhân giống loài lan hoàng thảo sáp (*Dendrobium Crepidatum* Lindl. & Paxt.) *in vitro*", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 48 (5), tr: 89-95.
- [8]. Nguyễn Thị Lại, Phạm Hương Sơn, Vũ Mạnh Hải, Tống Xuân Trung, (2018), "Nghiên cứu nhân giống lan Hoàng thảo Nghệ tâm (*Dendrobium loddigesii* Rolfe) bằng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào", *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Việt Nam*, 60(5), tr: 60-64.
- [9]. 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), tr: 917.
- [10]. Nguyễn Hoàng Lộc (2007), *Giáo trình nhập môn công nghệ sinh học*, Nxb Đại học Huế.
- [11]. Mahendran G., Narmatha Bai V. (2012), "Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from seed derived protocorms of *Cymbidium bicolor* Lindl.", *Scientia Horticulturae*, 135, pp: 40 - 44.

- [12]. Võ Thị Bạch Mai (2004), *Sự phát triển chồi và rễ*, Nxb Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.
- [13]. Martin K.P., Madassery J. (2006), “Rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants and protocorm like bodies”, *Sci.Hort.*, 108, Pp: 95-99.
- [14]. Murashige T., Skoog F., (1962), “A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures”, *Physiol Plant*, 15, pp: 473-497.
- [15]. Naing AH, Chung JD, Lim KB (2011), “Plant regeneration through indirect somatic embryogenesis in *Coelogyne cristata* orchid”, *Am. J. Plant Sci*, 2, pp: 262-267.
- [16]. Nguyễn Thị Sơn, Từ Bích Thủy, Đặng Thị Nhàn, Nguyễn Thị Lý Anh, Hoàng Thị Nga, 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), tr: 1274-1282.
- [17]. 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), tr: 16-21.
- [18] Nguyễn Bảo Toàn (2010), *Giáo trình Nuôi cấy mô tế bào thực vật*. Nxb Đại Học Cần Thơ.
- [19]. Nguyễn Văn Việt (2017), “Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* trong nhân giống lan Hoàng thảo kèn (*Dendrobium luteiflorum* Lindley)”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, 4, tr: 39-45.

RESEARCH IN VITRO PROPAGATION OF *DENDROBIUM ANOSMUM* LINDL. FROM DORMANT BUDS ON THE STEM

Vi Thi Xuan Thuy^{1*}, Pham Hong Son¹, Tran Thi Mung¹,
Tran Thi Hong Xuan¹, Pham Hoang Dan¹, Ha Dang Chien²

¹Tay Bac University; ²Hanoi 2 University of Education ;

Abstract: Stems of *Dendrobium anosmum* Lindl. contain healthy dormant buds were double sterilized in $HgCl_2$ 0.1% in 9 minutes (7 minutes for the 1st time and 2 minutes for the 2nd time) for the highest clean and regeneration rate at 47.86%. Samples grown on MS medium added BAP 1.5 mg/l was suitable for shoots regeneration from explants with shoot regeneration rate of 72.58%, good green shoots. MS medium added BAP 1.5 mg/l and α -NAA 0.5 mg/l was suitable for shoots cluster formation gaining the ratio 86.74% and the number of shoots/sample was 8.33, good green shoots. Shoots of *Dendrobium anosmum* Lindl. were the best growth on medium MS added 15% coconut water. MS medium added α -NAA 0.7 mg/l was suitable for the rooting of shoots of *Dendrobium anosmum* Lindl. After 8 weeks, the number of roots/buds was 8.36, the root length was 5.03 cm, and the highest stem was 2.84 cm. These results are the basis for *in vitro* propagation of *Dendrobium anosmum* Lindl. to contribute to the protection and development of genetic resources and possibly commercialization of this rare species.

Keywords: *Dendrobium anosmum* Lindl., BAP, *in vitro*, MS, α -NAA.

Ngày nhận bài: 16/06/2021. Ngày nhận đăng: 24/10/2021.

Liên lạc: Vi Thị Xuân Thủy, e - mail: xuanthuy@utb.edu.vn