

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* LAN HOÀNG THẢO ĐƠN CAM (*DENDROBIUM UNICUM SEIDENF.*)

Vì Thị Xuân Thủy^{1*}, Đinh Thị Phương¹, Nguyễn Thị Thúy An¹, Phạm Hồng Sơn¹, Hà
Đặng Chiến², Vũ Việt Dũng³

¹Trường Đại học Tây Bắc; ²Trường Đại học Sư Phạm Hà Nội 2; ³ Trường Cao đẳng Sơn La

Tóm tắt: Quả lan Hoàng thảo đơn cam (*Dendrobium unicum Seidenf.*) 09 tháng tuổi được khử trùng bề mặt bằng HgCl₂ 0,1% trong 7 phút cho tỷ lệ mẫu sạch, tái sinh cao nhất đạt 63,33%. Thí nghiệm nhân giống Lan hoàng thảo đơn cam được tiến hành trên môi trường MS (bổ sung saccharose 20 g/l, agar 8 g/l). Tỷ lệ phôi soma đạt cao nhất (65,18%) trên môi trường MS bổ sung thêm BAP 2 mg/l và α-NAA 0,5 mg/l. Phôi soma được nuôi trên môi trường MS bổ sung BAP 2 mg/l và kinetin 1 mg/l là phù hợp cho tái sinh, đạt 30,84 chồi/mẫu, chồi mập, sinh trưởng tốt, màu xanh đậm. Chồi lan Hoàng thảo đơn cam sinh trưởng tốt nhất trên môi trường MS bổ sung nước dừa 30 ml/l, sau 8 tuần nuôi cây cao 3,65 cm và có 6,12 lá. Môi trường MS chứa 30ml/l nước dừa và α-NAA 0,7 mg/l là tốt nhất cho chồi Hoàng thảo đơn cam ra rễ, đạt 6,28 rễ/ cây dài 0,93cm. Các kết quả trong nghiên cứu này là cơ sở nhân giống *in vitro* lan Hoàng thảo đơn cam, để góp phần bảo vệ, phát triển nguồn gen và có thể thương mại hóa loài quý hiếm này.

Từ khóa: *Dendrobium unicum Seidenf.*, *in vitro*, phong lan, protocorm, soma

1. MỞ ĐẦU

Việt Nam là quốc gia có điều kiện khí hậu thích hợp cho sự phát triển của các loài lan. Lan rừng ở nước ta phong phú, đa dạng với nhiều chủng loại. 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 [18], với đặc điểm hoa đẹp, màu khảm, tạo nên một tổ hợp và màu sắc rất phong phú, dáng thân cong buông thõng, chu kì 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, 15].

Hoàng thảo đơn cam (*Dendrobium unicum*) là một loài lan trong chi Lan hoàng thảo (*Dendrobium*). Hoàng thảo đơn cam phát triển tốt trong môi trường nhiệt độ từ mát mẻ đến ấm áp nhưng không chịu nóng [10] nên Sơn La là một địa phương có khí hậu phù hợp với sinh trưởng, phát triển của loài này. Hoàng thảo đơn cam có thân cao 10–15 cm, lá rụng vào mùa Thu. Hoa dài, bóng, bề rộng đầy đặn và nở bung cong ngược ra sau đặc trưng, hoa to 4–5 cm, 1-4 hoa mọc ở các đốt. Hoa nở vào mùa Xuân cho đến đầu mùa Hạ, có màu đỏ cam với một môi màu cam nhạt với các tĩnh mạch tối màu da cam, có mùi thơm đặc biệt [1]. Hiện nay ngoài

tự nhiên Hoàng thảo đơn cam còn rất ít, hiếm gặp do bị thu hái nhiều bởi vẻ đẹp của chúng.

Hạt phong lan không có nội nhũ hoặc có lớp nội nhũ rất mỏng, muốn nảy mầm được thì cần có nấm đặc hiệu cộng sinh nên khả năng nảy mầm trong tự nhiên là rất thấp [10, 14]. 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 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 [12]. Dựa trên tính toàn năng của tế bào thực vật, 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 [8]. Đã có nhiều tác giả nghiên cứu nhân giống *in vitro* một số loài lan thuộc chi *Dendrobium*. Năm 2010 Nguyễn Văn Kết và cs đã nhân *in vitro* thành công lan Hoàng thảo sấp (*Dendrobium Crepidatum* Lindl. & Paxt.) [6]. Năm 2013 Nguyễn Quỳnh Trang và cs (2013) đã nhân *in vitro* lan Phi điệp

tím (*Dendrobium anosmum*) từ hạt thành công [17]. Nguyễn Thị Sơn và cs (2014) đã nhân thành công loài lan (*Dendrobium Dendrobium officinale* Kimura et Migo (Thạch học Thiết bì) là một loài có giá trị làm thuốc quý thuộc chi *Dendrobium* [16]. Hoàng thảo kèn (*Dendrobium lituiflorum* Lindl.) đã được nhân *in vitro* thành công bởi Nguyễn Văn Việt (2017) [19]. Nguyễn Thị Lài và cs (2018) đã nhân thành công Hoàng thảo Nghệ tâm (*Dendrobium loddigesii* Rolfe) từ đỉnh sinh trưởng [7]. Các kết quả nghiên cứu này là cơ sở để nhân giống *in vitro* lan Hoàng thảo đơn cam (*Dendrobium unium*) góp phần bảo vệ, phát triển nguồn gen và có thể thương mại hóa loài quý hiếm này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Quả lan Hoàng thảo đơn cam (*Dendrobium unium*) chín sinh lý (9 tháng tuổi) thu thập ở Sơn La được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Môi trường và điều kiện nuôi cấy: Môi trường sử dụng trong nghiên cứu này là môi trường MS [13], 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 2.500 lux, nhiệt độ $20 \pm 2^\circ\text{C}$ và độ ẩm không khí là 75 - 85%.

Khử trùng mẫu tạo vật liệu khởi đầu in vitro: Quả của lan Hoàng thảo đơn cam được rửa sạch dưới vòi nước chảy, rửa lại với xà phòng loãng trong 20 phút. Sau đó được ngâm trong cồn 70° trong 2 phút, rửa lại nhiều lần với nước cất vô trùng. Sử dụng dung dịch HgCl_2 0,1% khử trùng quả 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 dọc theo chiều dài của quả lan, tách lấy hạt và cấy lên môi trường MS có chứa 20 g/l saccharose, 8 g/l agar. Thí nghiệm mỗi công thức 30m bình. Các chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ mẫu nhiễm (%), tỷ lệ mẫu sạch tái sinh (%), tỷ lệ mẫu sạch bị chết (%).

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.

Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ BAP và α -NAA đến khả năng tạo phôi soma từ protocorm: Sử dụng tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng Benzylaminopurine (BAP) và α -naphthaleneacetic acid (α -NAA) có nồng độ khác nhau trong môi trường MS có chứa saccharose 20 g/l, agar 8 g/l để khảo sát khả năng tạo phôi soma từ protocorm. Các chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ protocorm tạo phôi soma (%) và số phôi soma/1 protocorm hình thành sau 06 tuần.

Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của tổ hợp BAP và kinetin đến tái sinh chồi từ phôi soma: Sử dụng tổ hợp BAP và kinetin bổ sung môi trường MS có chứa saccharose 20 g/l, agar 8 g/l với nồng độ khác nhau để khảo sát ảnh hưởng lên khả năng hình thành chồi. Các chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ cụm chồi tái sinh (%), chất lượng chồi.

Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của nước dừa lên khả năng sinh trưởng chồi: Chồi của lan Hoàng thảo đơn cam có chiều cao 1cm được nuôi trên môi trường MS có chứa saccharose 20 g/l, agar 8 g/l bổ sung thể tích nước dừa khác nhau (0-50 ml/l) để khảo sát sự tác động của nước dừa lên khả năng sinh trưởng của chồi lan. 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 có chiều dài đạt tiêu chuẩn được đặt trên môi trường MS có chứa 30ml/l nước dừa, saccharose 20 g/l, agar 8 g/l có bổ sung α -NAA với nồng độ khác nhau (0,0 – 1mg/l) để khảo sát khả năng tạo rễ của chồi. Các chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ ra rễ (%), số rễ/chồi, chiều dài rễ (cm).

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*

Tạo được nguồn vật liệu khởi đầu là bước quan trọng có ý nghĩa quyết định đến sự thành công của cả quy trình trong nhân giống *in vitro*. Thành công của giai đoạn này không chỉ phụ thuộc vào đối tượng cụ thể, cách lấy mẫu, thời điểm lấy mẫu mà còn phụ thuộc vào chất khử

trùng và thời gian khử trùng. Hơn nữa, giai đoạn khử trùng mẫu vật yêu cầu không chỉ đạt tỷ lệ nhiễm thấp mà còn cần tỷ lệ sống cao và mẫu sinh trưởng tốt [9]. Quả lan Hoàng thảo đơn cam sau khi rửa sạch được trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% trong các khoảng thời gian khác nhau, kết quả sau 30 ngày thí nghiệm được trình bày ở bảng 1 và hình 1.

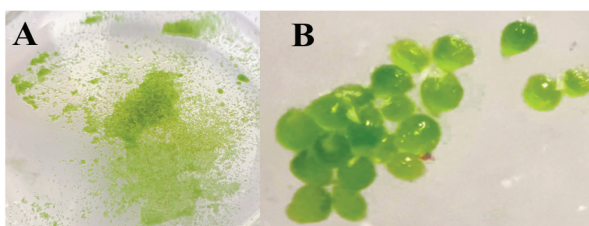
Kết quả bảng 1 cho thấy, tăng thời gian xử lý mẫu từ 3 phút lên 11 phút thì tỷ lệ mẫu nhiễm giảm rõ rệt từ 73,33% xuống còn 10 %, điều này cho thấy $HgCl_2$ 0,1% có khả năng khử trùng mẫu tốt. Tuy nhiên, khi tăng thời gian xử lý mẫu trong dung dịch $HgCl_2$ 0,1% tỷ lệ mẫu sạch tăng nhưng tỷ lệ mẫu tái sinh (nảy mầm) giảm, tỷ lệ mẫu chết tăng. Tỷ lệ mẫu chết khi khử trùng trong 3 phút là 0,00 % nhưng khi kéo dài

thời gian khử trùng lên 11 phút thì tỷ lệ mẫu chết tăng lên 43,33%. Tỷ lệ mẫu sạch, có khả năng tái sinh cũng có xu hướng giảm khi tăng thời gian khử trùng. Ở 7 phút xử lý mẫu tỷ lệ mẫu sạch, tái sinh đạt 63,33%, khi tăng lên 9 phút tỷ lệ này đạt 56,67% và kéo dài thời gian xử lý lên 11 phút tỷ lệ mẫu sạch tái sinh còn 46,67%. Như vậy, khi xử lý mẫu trong thời gian dài sẽ ảnh hưởng đến sức sống của mẫu, công thức thí nghiệm xử lý mẫu bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 7 phút cho tỷ lệ mẫu sạch, tái sinh cao nhất. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Quỳnh Trang và cs (2013) khử trùng quả lan Phi điệp tím (*Dendrobium anosmum*) bằng $HgCl_2$ 0,1% cho kết quả thời gian tối ưu cho khử trùng là 7 phút với tỷ lệ mẫu sạch tái sinh 56,56% [17].

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian xử lý $HgCl_2$ 0,1% đến khả năng tạo mẫu sạch và thể chồi Hoàng thảo đơn cam sau 30 ngày nuôi cấy

Thời gian (phút)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	
		Tỷ lệ mẫu tái sinh	Tỷ lệ mẫu chết
3	73,33 ^a	26,67 ^a	0,00 ^a
5	53,33 ^b	40,00 ^b	6,67 ^b
7	26,67 ^c	63,33 ^c	10,00 ^c
9	16,67 ^d	56,67 ^d	26,67 ^d
11	10,00 ^e	46,67 ^e	43,33 ^e

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. Hạt lan Hoàng thảo đơn cam nảy mầm sau 2 tuần nuôi cấy

(A: Ảnh chụp thường; B: Ảnh chụp qua kính hiển vi soi nổi)

3.2. Ảnh hưởng của BAP và α -NAA đến khả năng tạo phôi soma từ protocorm

Để tạo chồi từ protocorm xuất phát từ hạt có hai giai đoạn là tạo phôi soma từ protocorm và tái sinh chồi từ phôi soma [15]. Tạo phôi soma được coi như một phương pháp ưu việt nhất trong hệ thống nhân giống *in vitro* và chuyển gen [3,15]. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của

tổ hợp BAP và α -NAA đến khả năng tạo phôi soma từ protocorm của lan Hoàng thảo đơn cam sau 6 tuần nuôi cấy từ hạt. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 2 và hình 2.

Kết quả bảng 2 cho thấy, tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng BAP và α -NAA có tác động rõ rệt lên sự hình thành phôi soma của lan Hoàng thảo đơn cam. Hạt lan Hoàng thảo đơn cam gieo trên

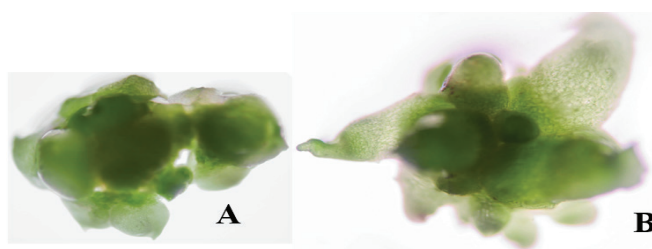
môi trường MS cơ bản (công thức đối chứng) cho tỷ lệ tạo phôi soma thấp nhất đạt 7,63%. Ở công thức thí nghiệm bổ sung 1 mg/l BAP và 0,3 mg/l α -NAA cho tỷ lệ tạo phôi soma thấp nhất trong các công thức có bổ sung tổ hợp chất

điều hòa sinh trưởng đạt 26,74% tăng so với đối chứng 3,5 lần. Môi trường MS bổ sung 2 mg/l BAP và 0,5 mg/l α -NAA cho tỷ lệ tạo phôi soma cao nhất đạt 65,18% cao gấp 8,52 lần so với công thức đối chứng.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BAP và α -NAA đến khả năng tạo phôi soma từ protocorm của lan Hoàng thảo đơn cam sau 6 tuần nuôi cấy

Công thức	Nồng độ BAP (mg/l)	Nồng độ α -NAA (mg/l)	Tỷ lệ protocorm tạo phôi soma (%)	Số lượng phôi soma /protocorm
CT1 (ĐC)	0	0,0	7,63 ^a	4,84 ^a
CT2	1	0,3	26,74 ^b	9,82 ^b
CT3	2	0,3	52,36 ^c	13,21 ^c
CT4	3	0,3	59,02 ^d	18,92 ^d
CT5	1	0,5	36,72 ^c	10,19 ^b
CT6	2	0,5	65,18 ^f	19,26 ^d
CT7	3	0,5	50,98 ^c	12,72 ^c

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 2. Hình ảnh phôi soma lan Hoàng thảo đơn cam được hình thành từ protocorm sau 4 tuần (A) và 6 tuần (B) nuôi cấy

Số lượng phôi soma/protocorm là một chỉ tiêu quan trọng cho hiệu quả tạo phôi, do đó chúng tôi tiếp tục khảo sát tác động của môi trường MS có bổ sung tổ hợp chất BAP và α -NAA nồng độ khác nhau đến số lượng phôi soma tạo thành/protocorm (Bảng 2). Kết quả bảng 2 cho thấy, chất điều hòa sinh trưởng BAP và α -NAA có ảnh hưởng đến số lượng phôi soma tạo thành. Ở công thức đối chứng số lượng phôi/protocorm chỉ đạt 4,84 phôi. Ở công thức bổ sung 1 mg/l BAP và 0,3 mg/l α -NAA cho số phôi soma/protocorm thấp nhất trong các công thức bổ sung hai chất điều hòa sinh trưởng này đạt 9,82 phôi cao gấp đối chứng 2,03 lần. Ở công thức 4 (3 mg/l BAP và 0,3 mg/l α -NAA) và công thức 6 (2 mg/l BAP và 0,5 mg/l α -NAA) có số phôi soma/protocorm lần lượt là 18,92 và 19,26 phôi, hai số liệu này không có sự sai khác thống kê với độ tin cậy 95% và đạt

số phôi cao nhất trong các công thức thí nghiệm. Tuy nhiên ở công thức 4 thì tỷ lệ protocorm tạo phôi soma chỉ đạt 59,02 trong khi ở công thức 6 tỷ lệ này là 65,18%. Như vậy, môi trường MS bổ sung 2 mg/l BAP và 0,5 mg/l α -NAA là phù hợp nhất cho khả năng tạo phôi soma của protocorm. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Mahendran và cs (2012) khi nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng trong tạo phôi soma của lan Đoản kiếm hai màu *Cymbidium bicolor* Lindl. [10] và nghiên cứu của Phan Thu Hiền và cs (2017) trên đối tượng lan Đại châu đỏ (*Rhynchostylis gigantea* L.) [4].

3.3. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và kinetin đến khả năng tái sinh chồi từ phôi soma

Các cụm phôi soma được chuyển sang môi trường MS bổ sung BAP và kinetin với nồng

độ khác nhau để khảo sát ảnh hưởng của hai chất điều hòa sinh trưởng này tới tái sinh, sinh trưởng của chồi. BAP và kinetin là hai chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinine, có vai

trò tăng cường sự phân bào, giúp các tế bào thực vật tăng sinh nhanh hơn, tạo điều kiện thuận lợi cho tái sinh [9]. Kết quả sau 6 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 3 và hình 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ BAP và kinetin lên tái sinh chồi lan Hoàng thảo đơn cam sau 6 tuần nuôi cấy

Công thức	Nồng độ BAP (mg/l)	Nồng độ kinetin (mg/l)	Số chồi/mẫu	Chất lượng chồi
CT1 (ĐC)	0	0,0	7,32 ^a	Chồi nhỏ, sinh trưởng rất chậm, màu xanh nhạt
CT2	1	0,5	21,67 ^b	Chồi nhỏ, sinh trưởng chậm, màu xanh nhạt
CT3	2	0,5	23,32 ^b	Chồi nhỏ, sinh trưởng chậm, màu xanh
CT4	3	0,5	32,08 ^c	Chồi nhỏ, sinh trưởng chậm, màu xanh
CT5	1	1	28,31 ^{bc}	Chồi trung bình, sinh trưởng trung bình, màu xanh đậm
CT6	2	1	30,84 ^c	Chồi to, sinh trưởng tốt, màu xanh đậm
CT7	3	1	39,54 ^d	Chồi trung bình, sinh trưởng trung bình, màu xanh

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 3. Hình ảnh chồi lan Hoàng thảo đơn cam nuôi trên môi trường MS bổ sung BAP và kinetin với các nồng độ khác nhau sau 6 tuần nuôi cấy

(A: 0 mg/l BAP- 0 mg/l kinetin; B: 1 mg/l BAP- 0,5 mg/l kinetin; C: 2 mg/l BAP- 0,5 mg/l kinetin; D: 3 mg/l BAP- 0,5 mg/l kinetin; E: 1 mg/l BAP- 1 mg/l kinetin; F: 2 mg/l BAP- 1 mg/l kinetin; G: 3 mg/l BAP- 1 mg/l kinetin)

Kết quả bảng 3 và hình 3 cho thấy, trên các môi trường MS bổ sung BAP và kinetin cho thấy sự khác biệt rõ rệt về tái sinh, sinh trưởng của chồi lan Hoàng thảo đơn cam với môi trường MS không bổ sung hai chất điều hòa sinh trưởng này. Chỉ nuôi trên môi trường MS mẫu chỉ đạt 7,32 chồi/mẫu, chồi sinh trưởng rất chậm, màu xanh nhạt. Khi bổ sung BAP và kinetin số chồi/mẫu tăng rõ rệt lên 21,67 – 39,45 chồi/mẫu. Ở công thức bổ sung 3 mg/l BAP và 1 mg/l kinetin cho số lượng chồi nhiều nhất đạt 39,45 chồi/mẫu tuy nhiên chồi không mập mạp, sinh trưởng không tốt màu xanh. Trong khi ở công thức bổ sung BAP 2 mg/l và kinetin 1 mg/l cho số chồi ít hơn đạt 30,84 chồi/mẫu cao hơn đối chứng

4,21 lần, nhưng chất lượng chồi tốt (chồi mập, sinh trưởng tốt, màu xanh đậm) đảm bảo cho các giai đoạn tiếp theo. Như vậy môi trường MS bổ sung BAP 2 mg/l – kinetin 1 mg/l là phù hợp cho tái sinh, sinh trưởng chồi lan Hoàng thảo đơn cam. Nghiên cứu của Phan Thu Hiền và cs (2017) môi trường MS bổ sung BAP 0,5 mg/l và kinetin 0,5 mg/l là tối ưu cho tái sinh chồi của lan Đại châu đỏ (*Rhynchostylis gigantea* L.) [4], có thể thấy nồng độ tối ưu các chất điều hòa sinh trưởng ảnh hưởng lên tái sinh, sinh trưởng chồi của các loài khác nhau là khác nhau.

3.4. Ảnh hưởng của nước dừa lên khả năng sinh trưởng chồi

Nước dừa có chứa nhiều chất dinh dưỡng khác nhau bao gồm amino acid, đường, khoáng chất và các phytohormon, ethylene, ABA, phenol... có tác dụng trong việc kích thích phân bào và kích thích sự phát triển ở một số thực vật [10]. Chồi lan Hoàng thảo đơn cam có chiều

cao 1cm được chuyển sang môi trường MS có bổ sung nước dừa với nồng độ khác nhau (0, 10, 20, 30, 40, 50 ml/l) để khảo sát sự tác động của nước dừa lên khả năng sinh trưởng của chồi. Sau 08 tuần nuôi cấy kết quả được trình bày ở bảng 4 và hình 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa lên sinh trưởng của chồi lan Hoàng thảo đơn cam sau 8 tuần nuôi cấy

Công thức	Nồng độ nước dừa (ml/l)	Chiều cao cây (cm)	Số lượng lá/cây	Chất lượng chồi
CT1 (ĐC)	0	1,85 ^a	3,57 ^a	Chồi nhỏ, màu xanh
CT2	10	2,57 ^b	4,16 ^b	Chồi trung bình, màu xanh
CT3	20	2,72 ^b	5,86 ^c	Chồi trung bình, màu xanh đậm
CT4	30	3,65 ^c	6,12 ^d	Chồi mập, màu xanh đậm
CT5	40	3,02 ^{bc}	5,46 ^c	Chồi trung bình, màu xanh đậm
CT6	50	2,84 ^b	5,32 ^{bc}	Chồi trung bình, màu xanh

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 4. Hình ảnh chồi lan được nuôi trên MS bổ sung nước dừa với các nồng độ khác nhau sau 8 tuần nuôi cấy

Kết quả nghiên cứu bảng 4 và hình 4 cho thấy nước dừa có tác động mạnh mẽ tới sinh trưởng của chồi lan Hoàng thảo đơn cam. Chồi được nuôi trên môi trường MS không bổ sung nước dừa, chiều cao trung bình của đoạn thân sau 08 tuần nuôi cấy đạt 1,85 cm có 3,57 lá, chồi nhỏ, màu xanh. 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 10 ml/l, chiều cao trung bình các cây đạt 2,57 cm với 4,16 lá và chồi kích thước trung bình, màu xanh. Khi tăng nước dừa lên 30ml/l cho thấy cây sinh trưởng tốt nhất với chiều cao đạt 3,65 cm gấp 1,97 lần so với đối chứng, số lá đạt được 6,12 lá và chồi mập mập, màu xanh đậm. Khi tăng thể tích nước dừa lên 40 và 50 ml/l thì cây sinh trưởng có xu hướng yếu đi, chiều cao cây chỉ đạt lần lượt 3,02 và 2,84 cm. Nguyên nhân của hiện tượng này có thể do lượng phytohormone hoặc các

chất khoáng trong nước dừa sẽ gây ức chế sinh trưởng của lan Hoàng thảo đơn cam trong điều kiện *in vitro* khi được bổ sung lượng lớn trong môi trường nuôi cấy. 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* cho thấy, môi trường 1/2 MS bổ sung 15% nước dừa là tốt nhất [5]. Trong khi nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, môi trường MS có bổ sung nước dừa 30 ml/l cho hiệu quả sinh trưởng chồi tốt nhất. Có thể thấy đối tượng nuôi cấy khác nhau thì nồng độ nước dừa phù hợp cho sinh trưởng là khác nhau.

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

Trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật, nhóm chất điều hòa sinh trưởng auxin được sử dụng để kích thích phân chia tế bào và phân hóa rễ. α -NAA là chất thuộc nhóm auxin được sử dụng phổ biến trong nuôi cấy mô và tế bào thực

vật [8, 9]. Ảnh hưởng của α -NAA tới hình thành rễ của lan Hoàng thảo đơn cam đã được khảo

sát, sau 8 tuần nuôi cấy kết quả được thể hiện ở bảng 5 và hình 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ α -NAA lên sự tạo rễ cây Hoàng thảo đơn cam sau 8 tuần nuôi cấy

Công thức thí nghiệm	Nồng độ α -NAA (mg/l)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)
CT1	0,0	28,13	2,19 ^a	0,33 ^a
CT2	0,2	100	3,64 ^b	0,42 ^b
CT3	0,5	100	4,93 ^c	0,67 ^c
CT4	0,7	100	6,28 ^d	0,93 ^d
CT5	1,0	100	5,02 ^c	0,78 ^c

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

Dựa vào kết quả bảng 5 cho thấy, α -NAA có ảnh hưởng rõ rệt lên khả năng tạo rễ của giống lan Hoàng thảo đơn cam. Trên môi trường đối chứng không bổ sung α -NAA, cây lan Hoàng thảo đơn cam có phản ứng ra rễ nhưng tỷ lệ thấp, chỉ đạt 28,13%, số rễ/chồi đạt 2,19, chiều dài 0,33 cm. Trong khi tất cả các công thức thí nghiệm môi trường có bổ sung α -NAA đều hình thành rễ. Khi tăng nồng độ α -NAA từ 0,2 – 0,7 mg/l thì số lượng rễ, chiều dài rễ tăng. Ở môi trường bổ sung α -NAA ở nồng độ 0,7 mg/l cho

số lượng rễ hình thành cao nhất 6,28 rễ/cây cao gấp 2,87 lần đối chứng và dài 0,93 cm, hơn nữa rễ có một lớp mô hút ẩm dày, màu xám bạc, chóp rễ có màu xanh điều này thuận lợi cho sự phát triển của chồi và rễ ở giai đoạn vườn ươm. Khi tăng nồng độ α -NAA lên 1 mg/l thì số lượng rễ giảm còn 5,02 và chiều dài chỉ đạt 0,78 cm (Hình 5). 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 [11].



Hình 5. Hình ảnh rễ hình thành từ chồi lan Hoàng thảo đơn cam trên môi trường bổ sung α -NAA nồng độ khác nhau

(A: 0 mg/l α -NAA; B: 0,2 mg/l α -NAA; C: 0,5 mg/l α -NAA; D: 0,7 mg/l α -NAA; E: 1 mg/l α -NAA)

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 học 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 học 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 [4, 5, 16].

KẾT LUẬN

Khử trùng bề mặt quả lan Hoàng thảo đơn cam (*Dendrobium unicum*) bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 7 phút cho tỷ lệ mẫu sạch, tái sinh cao nhất đạt 63,33%.

Đối với lan Hoàng thảo đơn cam nuôi trên môi trường MS (chứa saccharose 20 g/l, agar 8 g/l) bổ sung BAP 2 mg/l và 0,5 mg/l α -NAA cho tỷ lệ tạo phôi soma cao nhất đạt 65,18%.

Môi trường MS bổ sung BAP 2 mg/l và kinetin 0,1 mg/l phù hợp nhất cho tái sinh phôi

soma đạt 30,84 chồi/mẫu, chồi mập, sinh trưởng tốt, màu xanh đậm.

Chồi sinh trưởng tốt nhất trên môi trường MS bổ sung nước dừa 30ml/l, sau 8 tuần nuôi cấy đạt cây cao 3,65 cm và có 6,12 lá.

Môi trường ra rễ phù hợp cho Hoàng thảo đơn cam là môi trường MS có chứa nước dừa 30ml/l, bổ sung α -NAA 0,7 mg/l đạt 6,28 rễ/cây với chiều dài 0,93 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 2020-53

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyễn Tiến Bàn (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]. Phan Thị Thu Hiền, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà (2015), “Quy trình chuyển gen hiệu quả vào phôi soma của giống mía ROC22 (*Saccharum officinarum* L.) thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*”, *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN*, 31 (4S), tr:108- 114.
- [4]. Phan Thị Thu Hiền, Nguyễn Văn Đính (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 Cương, 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 Văn Kết, Nguyễn Văn Vinh (2010), “Nghiên cứu khả năng nhân giống loài lan hoàng thảo sấp (*Dendrobium Crepidatum* Lindl. & Paxt.) *in vitro*”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 48 (5), tr: 89-95.
- [7]. 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.
- [8]. 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.
- [9]. Nguyễn Hoàng Lộc (2007), *Giáo trình nhập môn công nghệ sinh học*, Nxb Đại học Huế.
- [10]. 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.
- [11]. Võ Thị Bạch Mai (2004), *Sự phát triển chồi và rễ*, Nxb Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.
- [12]. 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.
- [13]. Murashige T., Skoog F., (1962), “A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures”, *Physiol Plant*, 15, pp: 473-497.
- [14]. 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.
- [15]. Nguyễn Công Nghiệp (2000), *Trồng hoa lan*, Nxb Trẻ, 2000.
- [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斛 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]. Đào Thanh Vân, Đặng Thị Tố Nga (2008), *Giáo trình hoa lan*, Nxb Nông nghiệp.
- [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 UNICUM SEIDENF.*

Vì Thị Xuân Thủy^{1*}, Đinh Thị Phương¹, Phạm Hồng Sơn¹, Nguyễn Thị Thủy An¹, Hà Dang Chien², Vu Việt Dũng³

¹Tay Bac University; ²Hanoi 2 University of Education ; ³Son La College

Abstract: The 9 months old *Dendrobium unicum Seidenf.* fruits sterilized in HgCl₂ 0.1% in 7 minutes give the highest percentages of clean and regenerated at 63.33%. MS medium (containing 20 g/l saccharose, 8 g/l agar) added BAP 2 mg/l and α -NAA 0.5 mg/l gives the highest somatic embryos reaching 65.18%. Somatic embryos grown on MS medium containing supplemented with BAP 2 mg/l and kinetin 1mg/l are the best for regeneration with 30.84 shoots/sample, and shoots grow well. MS medium containing water of coconut 30 ml/l is the best for shoot growth; after 8 weeks, plants are 3.65 cm high and have 6.12 leaves. MS medium containing 30ml/l water coconut and α -NAA 0.7 mg/l is the best rooting, reaching 6.28 roots/plant with 0.93cm long. These results are the basis for *in vitro* propagation of *Dendrobium unicum Seidenf.* to contribute to the protection and development of genetic resources and possibly commercialization of this rare species.

Keywords: *Dendrobium unicum Seidenf.*, *in vitro*, orchid, protocorm, soma

Ngày nhận bài: 09/10/2020. Ngày nhận đăng: 25/11/2020.

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