

NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY LAN THẠCH HỘC TÍA (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)

Vũ Ngọc Lan*, Nguyễn Tuấn Anh, Nguyễn Thị Hoà, Phạm Tuấn Anh, Nguyễn Thị Phương Dung

Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: vnlan@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 16.02.2024

Ngày chấp nhận đăng: 12.04.2024

TÓM TẮT

Lan Thạch hộc tía (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) thuộc chi Hoàng thảo là một loài lan quý hiếm và đang bị đe dọa tuyệt chủng. Nghiên cứu nhân giống *in vitro* được thực hiện với mục đích bảo tồn và phát triển nguồn gen giống lan quý này. Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (RCD) với ba lần nhắc lại. Kết quả nghiên cứu cho thấy, nguồn vật liệu ban đầu là quả lan đã tạo được 100% mẫu sống, phát sinh protocorn và chồi, ưu thế hơn so với nguồn vật liệu ban đầu là chồi lan (tỷ lệ mẫu sống chỉ 2-3%). Bổ sung thêm nước dừa vào môi trường nuôi cấy không mang lại hiệu quả rõ rệt trong quá trình phát sinh hình thái lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. Môi trường MS là phù hợp (hệ số nhân đạt 2,56 protocorn/8 tuần) cho quá trình nuôi cấy nhân nhanh cụm chồi lan. Bổ sung chất điều tiết sinh trưởng α -NAA ở nồng độ 1ppm hoặc BAP ở nồng độ 3ppm vào môi trường nền cho số lượng chồi lớn nhất (45 protocorn/8 tuần) và hệ số nhân chồi cao 2,61 protocorn/8 tuần). Đối với sinh trưởng *in vitro* của chồi lan, nền môi trường khoáng RE bổ sung thêm 0,1% than hoạt tính là tối ưu cho tạo cây hoàn chỉnh.

Từ khóa: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo, α -NAA, BAP, RE, than hoạt tính.

In vitro Micropropagation of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

ABSTRACT

Dendrobium officinale Kimura et Migo of the genus *Dendrobium* is a rare and endangered orchid species. *In vitro* micropropagation was carried out for preserving and developing this precious orchid genetic resource. All experiments were arranged in a randomized complete design (RCD) with three replicates. The results showed that the fruit as initial material source produced 100% survival of explants, generating protocorn and shoots and superior to the initial material source of using buds (rate of survived explants was only 2-3%). The addition of coconut water to the culture medium did not have a clear effect on the morphogenesis of *Dendrobium officinale*. The MS medium was the most suitable for rapid multiplication of orchid shoot clusters (2.56 protocorn/8 weeks). Adding growth regulator α -NAA at a concentration of 1ppm or BAP at a concentration of 3ppm to the basal medium produced the largest number of shoots (45 protocorn/8 weeks) and high shoot multiplication coefficient (2.61 protocorn/8 weeks). For *in vitro* growth of orchid shoots, RE mineral culture medium supplemented with 0.1% activated charcoal was optimal for plantlet regeneration.

Keywords: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo, *in vitro* propagation α -NAA, BAP, RE, activated charcoal.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hoàng thảo là một trong những chi lớn nhất của họ Lan (Orchidaceae). Ở Việt Nam hiện biết 107 loài và 1 thứ thuộc chi Hoàng thảo, phân bố chủ yếu ở vùng núi từ Bắc vào Nam và trên một số đảo ven biển (Đào Thị Thanh Vân & Đặng Thị Tố Nga, 2008). Tuy nhiên, trong quá trình phát triển kinh tế xã hội, do những

nguyên nhân khác nhau, nhiều loài Hoàng thảo ở nước ta đã bị tuyệt chủng hoặc đe dọa tuyệt chủng. Vì vậy, một số loài lan thuộc chi Hoàng thảo đã được đưa vào danh mục Đỏ của "Sách đỏ Việt Nam". Trong đó, lan Thạch hộc tía (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) là loài lan quý hiếm thuộc chi Hoàng thảo, đặc hữu của vùng Nam và Đông Nam Á. Ngoài giá trị thẩm mỹ, thân và hoa *Dendrobium officinale* Kimura

et Migo có nhiều hoạt chất có hoạt tính sinh học quý, được sử dụng làm thuốc trong đông y và y học Trung Quốc (Đỗ Tất Lợi, 2003). Nhiều nghiên cứu hiện đại cũng đã cho thấy các hoạt chất chứa trong lá và thân lan Thạch học có tác dụng tích cực đến việc điều trị một số loại bệnh ung thư (Chu & cs., 2014; Xiao & cs., 2011). Do đó, nhu cầu tiêu thụ lan Thạch học trên thị trường là rất lớn và là nguyên nhân khiến chúng đang bị khai thác cạn kiệt ngoài tự nhiên. Mặc dù điều kiện tự nhiên của Việt Nam rất phù hợp với sinh trưởng của lan Thạch học, nhưng do tác động của quá trình đô thị hoá nông thôn và miền núi, sinh cảnh tự nhiên của lan Thạch học đã mất đi nhiều làm cho sự sinh trưởng, sinh sản ngoài tự nhiên của lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo là rất hạn chế. Mặc dù đã có một số nghiên cứu *in vitro* về giống lan này như của Nguyễn Thị Sơn & cs. (2012), Vũ Quốc Luận & cs. (2021), tuy nhiên nghiên cứu để hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* cây lan Thạch học tía *Dendrobium officinale* Kimura et Migo phục vụ mục đích bảo tồn và phát triển loài lan này là hết sức cần thiết.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Vật liệu nghiên cứu là chồi mầm và quả lan Thạch học tía *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (quả 5 tháng tuổi, chín sinh lý có màu vàng, sờ mềm tay). Mẫu được thu thập ở các tỉnh miền núi Tây Bắc, Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đánh giá ảnh hưởng của chế độ khử trùng, nguồn vật liệu ban đầu, dinh dưỡng hữu cơ đến tỷ lệ sống, nảy mầm của chồi và hạt lan

Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của chế độ khử trùng quả đến tỷ lệ sống và phát sinh hình thái. Thí nghiệm gồm 3 công thức: CT1: Cồn 96°; CT2: H₂O₂ 2%; CT3: HgCl₂ 0,1%. Quả mẫu được rửa sạch bằng nước cất vô trùng, khử trùng 5 phút theo các công thức, sau đó tráng sạch lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng. Trong tủ cấy vô trùng quả được cắt, rạch và gieo vào môi trường.

Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của chế độ khử trùng chồi đến tỷ lệ mẫu sống. Các chồi mẫu được rửa sạch bằng nước cất vô trùng, ngâm trong dung dịch cồn 70° trong 1 phút rồi được rửa sạch lại bằng nước cất vô trùng, sau đó chuyển sang ngâm lần lượt trong các dung dịch 1 và dung dịch 2 theo các công thức, sau đó được cấy vào môi trường nuôi, cụ thể như sau:

Công thức	Dung dịch 1 (ngâm trong 3 phút)	Dung dịch 2 (ngâm trong 1 phút)
CT1	H ₂ O ₂ 2%	H ₂ O ₂ 2%
CT2	H ₂ O ₂ 2%	HgCl ₂ 0,1%
CT3	HgCl ₂ 0,1%	HgCl ₂ 0,1%

Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của nước dừa (nước dừa) đến khả năng phát sinh hình thái của mầm cấy. Thí nghiệm gồm 5 công thức: CT1: 0% nước dừa (ĐC); CT2: 5% nước dừa; CT3: 10% nước dừa; CT4: 25% nước dừa; CT5: 50% nước dừa

Các thí nghiệm 1, 2, 3 được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ, 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại trên 30 bình mẫu. Môi trường nuôi cấy của thí nghiệm 1, 2, 3 là: MS + 1% sacaroza + 0,6% agar.

2.2.2. Đánh giá ảnh hưởng của môi trường nền và các chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh cụm chồi lan *in vitro*

Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của các loại nền môi trường nuôi cấy đến khả năng nhân nhanh cụm chồi lan *in vitro*. Thí nghiệm gồm 4 công thức: CT1: Nền MS; CT2: Nền VW, CT3: Nền KC; CT4: Nền RE. Các công thức tương ứng với từng loại môi trường riêng đều được bổ sung thêm 1% sacaroza + 0,6% agar.

Thí nghiệm 5: Ảnh hưởng của nồng độ α -NAA đến khả năng nhân nhanh cụm chồi lan *in vitro*. Thí nghiệm gồm 5 công thức. CT1: 0ppm α -NAA (ĐC); CT2: 0,5ppm α -NAA; CT3: 1,0ppm α -NAA; CT4: 2,0ppm α -NAA; CT5: 4,0ppm α -NAA.

Các công thức thí nghiệm đều được tiến hành trên nền môi trường MS có bổ sung 1% sacaroza + 0,6% agar và các nồng độ α -NAA tương ứng với mỗi công thức thí nghiệm.

Thí nghiệm 6: Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng nhân nhanh cụm chồi lan *in vitro*. Thí nghiệm gồm 5 công thức. CT1: 0ppm BAP

(ĐC); CT2: 1,0ppm BAP; CT3: 2,0ppm BAP; CT4: 3,0ppm BAP; CT5: 4,0ppm BAP.

Các công thức thí nghiệm được tiến hành trên nền môi trường MS có bổ sung 1% sacaroza + 0,6% agar và các nồng độ BAP tương ứng.

Các thí nghiệm 4, 5, 6 được tiến hành lặp lại 3 lần, mỗi công thức cấy 3 bình, mỗi bình cấy 3 cụm chồi, mỗi cụm chồi có đường kính 10mm và chứa 15 chồi.

2.2.3. Đánh giá ảnh hưởng của môi trường nền và than hoạt tính đến sinh trưởng của chồi lan.

Thí nghiệm 7: Ảnh hưởng của nền môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng của chồi lan *in vitro*

Thí nghiệm gồm 4 công thức: CT1: Nền MS; CT2: Nền VW, CT3: Nền KC; CT4: Nền RE. Trong từng công thức đều được bổ sung 1% sacaroza + 0,6% agar.

Thí nghiệm 8: Ảnh hưởng của than hoạt tính (THT) đến khả năng ra rễ và sinh trưởng của chồi lan *in vitro*

Thí nghiệm được tiến hành trên nền môi trường phù hợp nhất của thí nghiệm 7. Thí nghiệm gồm 5 công thức: CT1: 0% THT (ĐC); CT2: 0,05% THT; CT3: 0,1% THT; CT4: 0,15% THT; CT5: 0,2% THT.

Các thí nghiệm 7, 8 được tiến hành lặp lại 3 lần, mỗi công thức cấy 3 bình, mỗi bình cấy 3 chồi, mỗi chồi có chiều cao 2,5cm, số lá là 3 chiếc và cùng đường kính thân.

Tất cả các thí nghiệm đều được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (RCD).

2.3. Chỉ tiêu nghiên cứu

Tỷ lệ mẫu sống, tỷ lệ mẫu chết; tỷ lệ phát sinh protocorn; tỷ lệ phát sinh chồi, hệ số nhân; số lá/chồi; số rễ/chồi; chiều cao cây, chiều dài rễ.

2.4. Thời gian nghiên cứu

Từ tháng 1/2022 đến tháng 1/2023.

2.5. Xử lý số liệu

Số liệu thu thập được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và Irristat 5.0. Sự sai khác giữa

các giá trị trung bình của các thông số được đánh giá theo phân tích phương sai (ANOVA), so sánh giữa các cặp trung bình theo tiêu chuẩn LSD_{0,05}.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của chế độ khử trùng, nguồn vật liệu ban đầu và dinh dưỡng hữu cơ đến phát sinh hình thái mẫu lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

3.1.1. Ảnh hưởng của chế độ khử trùng và nguồn vật liệu ban đầu

Tạo nguồn vật liệu ban đầu là khâu quan trọng quyết định sự thành công trong việc nuôi cấy mô. Vật liệu khởi đầu phải được khử trùng để đảm bảo sản phẩm trong nuôi cấy mô là sạch bệnh và có khả năng phát sinh hình thái.

Các thí nghiệm khử trùng quả lan (Bảng 1, Hình 1) đều cho kết quả tối ưu, tỷ lệ mẫu sống, vô trùng đạt 100% và tỷ lệ mẫu sống phát sinh protocorn, chồi đạt 100%. Sau 6 tuần theo dõi mẫu cấy ở các công thức thí nghiệm đều hình thành các chồi có màu xanh tương đương nhau. Như vậy, cả 3 công thức thí nghiệm đều cho kết quả tối ưu như nhau nhưng xét về mặt hiệu quả thì công thức khử trùng 1 (Nhúng quả trong cồn 96° rồi đốt trên ngọn lửa đèn cồn) có nhiều ưu điểm hơn cả vì hiệu quả cao nhất, dễ thực hiện, ít tốn kém hóa chất và hóa chất sử dụng không ảnh hưởng độc hại đến sức khỏe con người.

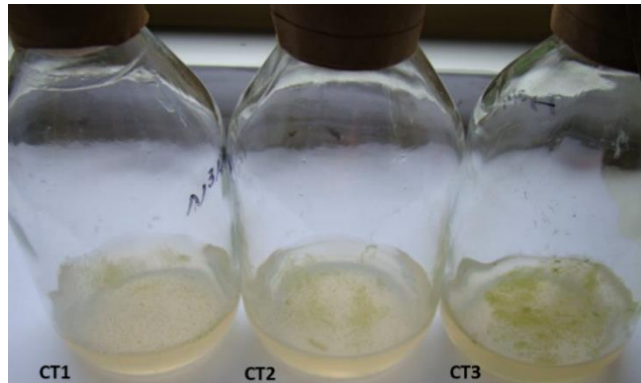
Đánh giá hiệu quả khử trùng nguồn vật liệu chồi lan có nhiều ý nghĩa bởi nguồn vật liệu này có ưu điểm là giữ được hoàn toàn đặc tính di truyền của cây mẹ. Tuy nhiên, thí nghiệm nghiên cứu chế độ khử trùng chồi đối với loài lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo tiến hành đã không cho kết quả khả quan (Bảng 2).

Ở giai đoạn đầu, công thức 1 (khử trùng 2 lần bằng dung dịch H₂O₂ 2%) cho kết quả tốt hơn so với các công thức còn lại (tỷ lệ mẫu chết chỉ có 24,56%), tuy nhiên ở giai đoạn sau tỷ lệ mẫu nhiễm khuẩn lại rất cao (72,30%) và sau 6 tuần thí nghiệm tỷ lệ mẫu sống ở các công thức thí nghiệm cũng chỉ đạt từ 2%-3,5%.

Bảng 1. Ảnh hưởng của chế độ khử trùng quả đến tỷ lệ mẫu sống và hình thái mẫu lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (sau 6 tuần)

Công thức	Tỷ lệ mẫu sống, vô trùng (%)	Tỷ lệ mẫu sống có phát sinh protocorm, chồi (%)	Hình thái mẫu
CT1	100	100	Xanh
CT2	100	100	Xanh
CT3	100	100	Xanh

Ghi chú: CT1: Cồn 96°; CT2: H_2O_2 2%; CT3: $HgCl_2$ 0,1%.



Hình 1. Thí nghiệm vào mẫu gieo hạt lan

Bảng 2. Ảnh hưởng của chế độ khử trùng chồi đến tỷ lệ mẫu sống lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (sau 6 tuần)

Công thức	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sống, vô trùng (%)
CT1	24,56	72,30	3,14
CT2	57,42	40,56	2,02
CT3	40,02	56,50	3,48

Ghi chú: CT1: H_2O_2 2% (3 phút) và H_2O_2 2% (1 phút); CT2: H_2O_2 2% (3 phút) và $HgCl_2$ 0,1% (1 phút); CT3: $HgCl_2$ 0,1% (3 phút) và $HgCl_2$ 0,1% (1 phút)

Như vậy, phương pháp khử trùng mẫu từ chồi lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo là không khả thi vì cần nhiều công sức, hóa chất cũng như nguồn vật liệu ban đầu trong khi đó nguồn mẫu thu lại được rất ít. Thực tế cho thấy, phong lan rừng nói chung và loài lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo nói riêng sống ở những nơi ẩm thấp, là nơi ẩn náu của rất nhiều loài vi sinh vật gây hại, những loại vi sinh vật này sống cộng sinh trên cây lan. Do đó, khi tách chồi lan để đưa vào nuôi cấy, các vi sinh vật này sẽ dễ dàng xâm nhập vào vết cắt. Việc khử trùng mẫu phải đảm bảo các tiêu chí loại bỏ tất cả các vi sinh vật gây hại đồng thời vẫn phải

đảm bảo sức sống cho mẫu đưa vào nuôi cấy. Điều này là hết sức khó khăn bởi nếu tiến hành khử trùng nhiều lần hoặc sử dụng các loại hóa chất đặc hiệu, mẫu cấy sẽ bị tổn thương về sinh lý hoặc chết. Kết quả từ hai thí nghiệm trên cho thấy, đối với nhân giống *in vitro* lan Thạch học tía (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) thì nguồn vật liệu đưa vào nuôi cấy tốt nhất là quả lan và chế độ khử trùng tối ưu là nhúng quả trong cồn 96° rồi hơ trên ngọn lửa đèn cồn. Kết quả nghiên cứu này tương tự các công trình công bố trước đó về chế độ khử trùng mẫu quả của các giống lan như của Vũ Ngọc Lan & Nguyễn Thị Lý Anh (2013) đối với lan Thạch

học, Hoàng Thị Giang & cs. (2010) trên giống lan Hải hàng, Nguyễn Thị Sơn & cs. (2012) trên giống lan Hoàng thảo Long nhãn, hay như của Nguyễn Văn Việt (2017) trên giống lan Hoàng thảo kèn.

3.1.2. Ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng phát sinh hình thái khi nuôi cấy khởi động

Nhiều nghiên cứu cho thấy nước dừa là nguồn dinh dưỡng phong phú, sẵn có, hỗ trợ hiệu quả cho nuôi cấy *in vitro*. Kết quả thí nghiệm ảnh hưởng của lượng nước dừa tới phát sinh hình thái của lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (Bảng 3.) cho thấy, ở tất cả các công thức thí nghiệm có bổ sung các nồng độ nước dừa đều phát sinh hình thái chồi nhưng đa số mẫu nhỏ có màu xanh trừ công thức 1 (xanh nhạt). Công thức 4 khi bổ sung thêm 25% nước dừa cho chất lượng chồi mập hơn các công thức thí nghiệm còn lại (Bảng 3). Mặc dù vậy, xét về hiệu quả kinh tế thì lại không có ý nghĩa do phải sử dụng nước dừa ở nồng độ quá cao, tuy mức độ chồi có mập hơn so với các công thức khác. Kết quả nghiên cứu này có chút sai khác so với công bố của Nguyễn Văn Việt (2017) (chỉ sử dụng môi trường Knops) đối với cây lan Hoàng thảo kèn, của Lee & cs. (2010) (sử dụng môi trường 1/4MS có bổ sung 30 g/l dịch chiết khoai tây và 30 g/l dịch chiết chuối hoặc 100 ml/l nước dừa) cho cây lan Hồ điệp, nhưng tương tự như nghiên cứu của Vũ Ngọc Lan (2012) (cảm ứng phát sinh hình thái chồi với nồng độ nước dừa 100 ml/l trên nền môi trường MS) cho hai loài lan *Dendrobium Nobile* Lind., *Dendrobium Chrysanthum* Lind.

3.2. Ảnh hưởng của môi trường nền và các chất điều tiết sinh trưởng tới khả năng nhân nhanh cụm chồi lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

3.2.1. Ảnh hưởng của môi trường nền tới khả năng nhân nhanh cụm chồi lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

Hiện nay có rất nhiều nền môi trường nuôi cấy khác nhau đã được nghiên cứu, thực nghiệm và ứng dụng trong công nghệ nuôi cấy mô tế

bào. Những nền môi trường cơ bản này có thể được kết hợp bổ sung thêm một hay nhiều yếu tố dinh dưỡng khác nhằm tạo ra môi trường tối ưu cho từng giai đoạn trong nuôi cấy *in vitro* và cho từng loại cây trồng khác nhau. Khả năng nhân nhanh cụm chồi lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo đã được thực hiện trên 4 nền môi trường phổ biến hiện nay: MS, VW, KC và RE. Kết quả bảng 4 và hình 2 cho thấy, chồi được nuôi cấy trên nền môi trường MS và KC sau 8 tuần đều cho ra những chồi mới có thân mập hơn so với nền môi trường VW và RE. Tuy nhiên, công thức thí nghiệm sử dụng nền môi trường MS cho số chồi cao gấp 1,18 lần công thức nền RE với sự sai khác là có ý nghĩa thống kê ở mức độ tin cậy 95% và có hệ số nhân chồi cao nhất (2,56) (Bảng 4, Hình 2). Nền môi trường MS bổ sung 1% sacaroza + 0,6% agar là phù hợp cho quá trình tăng nhanh về số lượng chồi trong nuôi cấy nhân nhanh cụm chồi của giống lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Sơn & cs. (2012) trên giống lan Hoàng thảo Long nhãn, của Vũ Ngọc Lan & Nguyễn Thị Lý Anh (2013) và công bố của Phạm Văn Lộc & Lê Thị Hoài Thương (2016) trên giống lan Hoàng thảo kèn.

3.2.2. Ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh cụm chồi

Khi nuôi cấy *in vitro*, ngoài việc phải cung cấp các chất đa lượng, vi lượng, vitamin cho mô thực vật, cần bổ sung các chất điều tiết sinh trưởng ngoại sinh vào môi trường nuôi cấy, giúp điều khiển quá trình sinh trưởng phát triển theo mong muốn. Đánh giá ảnh hưởng của các chất điều tiết sinh trưởng α -NAA và BAP trong quá trình nhân nhanh cụm chồi lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo, kết quả được trình bày ở bảng 5 và bảng 6.

Các công thức có bổ sung α -NAA đều cho số chồi/cụm cao so với công thức ĐC, sự sai khác là có ý nghĩa thống kê ở mức 95%. Tuy nhiên, khi hàm lượng α -NAA bổ sung vào môi trường cao hơn 1ppm thì số chồi/cụm lại giảm dần. Như vậy, việc bổ sung thêm 1ppm α -NAA vào môi trường nuôi cấy nhân nhanh cụm chồi lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo là hiệu quả, phù hợp.

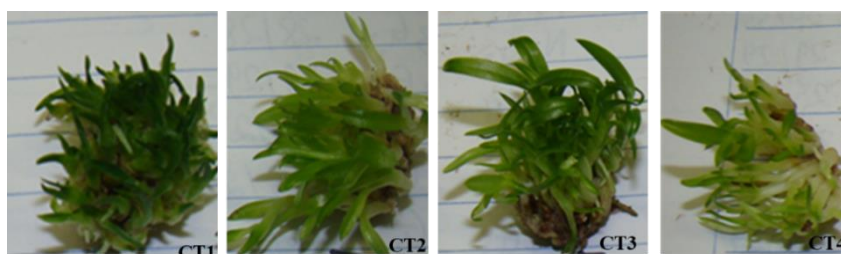
Bảng 3. Ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng phát sinh hình thái lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (sau 6 tuần)

Công thức	Nước dừa	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Tỷ lệ tạo protocorm (%)	Hình thái mẫu
CT1	0% nước dừa	80	20	Xanh nhạt, nhỏ
CT2	5% nước dừa	100	0	Xanh, nhỏ
CT3	10% nước dừa	100	0	Xanh, nhỏ
CT4	25% nước dừa	100	0	Xanh, mập
CT5	50% nước dừa	100	0	Xanh, nhỏ

Bảng 4. Ảnh hưởng của nền môi trường nuôi cấy đến khả năng nhân nhanh cụm chồi lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (sau 8 tuần nuôi cấy)

Công thức	Nền môi trường	Số chồi/cụm				Hệ số nhân	Hình thái cụm chồi
		Sau 2 tuần	Sau 4 tuần	Sau 6 tuần	Sau 8 tuần		
CT1	MS	17,75	21,75	34,15	45,40 ^a	2,56	XV, thân TB
CT2	VW	16,67	19,72	30,25	40,55 ^b	2,43	XV, thân mảnh
CT3	KC	16,86	20,03	30,75	41,05 ^b	2,43	XV, thân TB
CT4	RE	16,37	19,67	28,09	38,38 ^b	2,34	XV, thân mảnh
	LSD _{0,05}				3,82		
	CV (%)				4,9		

Ghi chú: XV: Xanh vàng, TB: Trung bình.



Hình 2. Cụm chồi lan ở các nền môi trường khác nhau (sau 8 tuần nuôi cấy)

Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ α -NAA đến khả năng nhân nhanh cụm chồi lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (sau 8 tuần nuôi cấy)

Công thức	Nồng độ α -NAA (ppm)	Số chồi/cụm				Hệ số nhân chồi	Hình thái mẫu
		Sau 2 tuần	Sau 4 tuần	Sau 6 tuần	Sau 8 tuần		
CT1	0 (ĐC)	15,55	18,23	24,25	33,69 ^b	2,17	XV, thân mảnh
CT2	0,5	17,83	21,33	31,16	43,16 ^a	2,42	XV, thân TB
CT3	1	18,23	22,57	32,23	45,53 ^a	2,50	XV, thân TB
CT4	2	18,03	22,30	31,67	44,30 ^a	2,46	XV, thân TB
CT5	4	18,43	20,43	28,43	42,43 ^a	2,30	XN, thân TB
	LSD _{0,05}				3,66		
	CV%				5,0		

Ghi chú: XV: Xanh vàng, XN: Xanh nhạt, TB: Trung bình.

Bảng 6. Ảnh hưởng các nồng độ BAP đến khả năng nhân nhanh cụm chồi lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

Công thức	Nồng độ BAP (ppm)	Số chồi/cụm				Hệ số nhân chồi	Hình thái mẫu
		Sau 2 tuần	Sau 4 tuần	Sau 6 tuần	Sau 8 tuần		
CT1	0 (ĐC)	16,23	18,23	26,57	34,57 ^{bc}	2,13	XN, thân mảnh
CT2	1	16,17	18,57	25,80	35,53 ^b	2,20	XN, thân mảnh
CT3	2	15,13	17,13	24,13	32,07 ^c	2,12	XV, thân mảnh
CT4	(3	17,33	22,33	33,17	45,16 ^a	2,61	XV, thân TB
CT5	4	15,43	17,61	23,48	32,25 ^c	2,09	XV, thân TB
	LSD _{0,05}				2,96		
	CV				4,9		

Ghi chú: XN: Xanh nhạt, XV: Xanh vàng, TB: Trung bình.

Bổ sung BAP với nồng độ 3ppm vào môi trường nền (CT3) có ảnh hưởng tích cực nhất tới quá trình nhân nhanh chồi lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo, cho số chồi/cụm cao nhất ở các tuần theo dõi, đặc biệt là tuần 8 với hệ số nhân là 2,61 chồi/cụm. Công thức 3ppm BAP có số chồi trên cụm lớn hơn hẳn và sai khác có ý nghĩa thống kê so với tất cả các công thức còn lại ở mức 95%. Nồng độ 1ppm α -NAA hoặc 3ppm BAP ở đây được sử dụng cho cảm ứng tạo chồi ở lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo cao hơn và có sai khác so với các công trình đã công bố trước đó của Nguyễn Văn Việt (2017) (nồng độ BAP cho cảm ứng tạo đa chồi là 0,8ppm) trên đối tượng lan Hoàng thảo kèn và của Hoàng Thị Giang & cs. (2010) trên giống lan Hải Hằng (chỉ sử dụng nền môi trường RE có bổ sung 150ml nước dừa, 100 g/l chuối cho cảm ứng tạo chồi và bổ sung 0,4-0,6ppm α -NAA vào môi trường cho khả năng ra rễ tốt nhất). Kết quả cũng tương đồng với nghiên cứu của Devi & cs. (2013) trên loài Quế lan hương (*Aerides odorata* Lour.).

3.3. Ảnh hưởng của nền môi trường và than hoạt tính đến sinh trưởng của chồi lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

3.3.1. Ảnh hưởng của nền môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng của chồi lan *in vitro*

Kết quả cho thấy CT4 (sử dụng nền môi trường RE) có chiều cao cây, số lá, số rễ là cao nhất (chiều cao trung bình đạt 5,28 cm/cây, số lá trung bình đạt 4,34 lá/cây, số rễ trung bình đạt

4,89 rễ/cây). Sự khác biệt về các thông số tăng trưởng rễ trong CT4 là có ý nghĩa thống kê khi so với các công thức khác và công thức đối chứng chỉ trừ số lá/cây (Bảng 7, Hình 3). Như vậy, nền môi trường nuôi cấy phù hợp nhất cho sinh trưởng của chồi lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo *in vitro* là nền khoáng RE. Kết quả nghiên cứu này tương tự như công bố trước đó của Hoàng Thị Giang & cs. (2010) trên đối tượng lan Hải Hằng và Nguyễn Thị Sơn & cs. (2012) đối với mẫu lan Hoàng thảo Long nhãn.

3.3.2. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng ra rễ và sinh trưởng của cây lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

Than hoạt tính (THT) đóng vai trò như là chất điều phối và thường được bổ sung vào môi trường ở giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh trong quá trình nuôi cấy *in vitro*. THT có khả năng hấp thụ bớt một số chất không có lợi cho sự phát triển của cây như các chất được sản sinh ra trong quá trình khử trùng hoặc do chính cây trồng tiết ra. Đôi khi THT cũng đóng vai trò như chất điều tiết sinh trưởng (Pan & Staden, 1998; Eymar & cs., 2000). Khi bổ sung THT vào môi trường nuôi cấy với nồng độ 0,1-0,3% có tác dụng loại trừ sự hóa nâu đối với các loài phong lan Phalenopsis, Cattleya và Aerides. Bên cạnh đó, THT được bổ sung vào môi trường có lợi cho việc hình thành rễ của cây do hạn chế mức độ chiếu sáng ở phần rễ (giúp cây thể hiện rõ được tính hướng địa) hoặc hấp thụ bớt các chất ức chế sự ra rễ có trong quá trình nuôi cấy mô tế bào.

Bảng 7. Ảnh hưởng của nền môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng của chồi lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (sau 8 tuần nuôi cấy)

Công thức	Môi trường	Chiều cao (cm)	Số lá/chồi	Số rễ/chồi
CT1	MS (ĐC)	4,07 ^b	4,16 ^a	4,29 ^b
CT2	VW	3,07 ^d	3,59 ^b	4,56 ^{ab}
CT3	KC	3,27 ^c	3,86 ^b	4,37 ^b
CT4	RE	5,28 ^a	4,34 ^a	4,89 ^a
	<i>LSD</i> _{0,05}	0,29	0,28	0,39
	CV%	4,2	3,8	3,9



Hình 3. Rễ của chồi lan ở các nền môi trường khác nhau (sau 8 tuần nuôi cấy)

Bảng 8. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng ra rễ và sinh trưởng của chồi lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (sau 30 ngày nuôi cấy)

Công thức	Hàm lượng than hoạt tính (%)	Tỷ lệ tạo rễ (%)			Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)	Chiều cao cây (cm)
		Sau 10 ngày	Sau 20 ngày	Sau 30 ngày			
CT1	0	0	8,89	80,00	0,80 ^e	1,37 ^d	4,54 ^b
CT2	0,05	0	15,56	100,00	1,64 ^d	2,64 ^c	4,61 ^b
CT3	0,1	0	45,58	100,00	3,26 ^a	2,83 ^c	4,98 ^a
CT4	0,15	0	57,78	100,00	1,93 ^c	3,30 ^b	4,46 ^b
CT5	0,20	0	66,67	100,00	2,13 ^b	3,65 ^a	4,01 ^c
	<i>LSD</i> _{0,05}				0,1	0,22	0,33
	CV%				3,2	4,5	4,1

Sau 30 ngày, kết quả nghiên cứu cho thấy, khi bổ sung THT vào môi trường nuôi cấy RE cho 100% các mẫu cấy đều hình thành rễ trong khi đó không bổ sung THT chỉ có 80% số mẫu cấy hình thành rễ. Mặt khác, trong số các công thức có bổ sung THT thì CT3 (bổ sung 0,1% THT) cho số lượng rễ sau 30 ngày nuôi cấy nhiều nhất (3,26 rễ), nhiều hơn có ý nghĩa thống kê ở mức 95% so với các công thức khác, đồng thời cây cũng đạt chiều cao lớn nhất. Các công thức bổ sung 0,15 và 0,20% THT tuy hình thành các rễ dài song số lượng rễ ít (chỉ được 1,93 và 2,13 rễ), cây thấp (Bảng 8). Điều này có thể do THT đã hấp phụ một số chất điều tiết sinh trưởng, dinh dưỡng dư thừa không cần thiết đã khiến cây phát triển

chậm (Pan & Staden, 1998). Kết quả này hoàn toàn trùng khớp với nghiên cứu trước đây của Nguyễn Thị Sơn & cs. (2012), tương tự như kết quả công bố của Hoàng Thị Giang & cs. (2010) và nghiên cứu về dịch chiết hữu cơ trên lan Hoàng thảo kèn của Đặng Thị Thanh Tâm & cs. (2021). Như vậy bổ sung vào môi trường nuôi cấy 0,1% THT là tối ưu cho tạo cây lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo hoàn chỉnh.

4. KẾT LUẬN

Nguồn vật liệu ban đầu là quả lan có ưu thế hơn so với chồi lan, tạo được 100% mẫu sống phát sinh chồi, trong khi tỷ lệ mẫu sống từ vật

liệu chồi chỉ khoảng 2-3%. Việc bổ sung thêm nước dừa vào môi trường nuôi cấy cho quá trình phát sinh hình thái lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo không mang lại hiệu quả rõ rệt so với đối chứng.

Môi trường MS là phù hợp nhất cho quá trình nuôi cấy nhân nhanh cụm chồi lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo.

Bổ sung chất điều tiết sinh trưởng α -NAA nồng độ 1ppm vào môi trường nền MS cho số chồi lớn nhất (45,53 chồi/cụm) và hệ số nhân đạt 2,5 chồi/8 tuần; BAP ở nồng độ 3ppm vào môi trường nền MS cho số chồi lớn nhất (45,16 chồi/cụm chồi) và hệ số nhân cao nhất (2,61 chồi/8 tuần).

Nền khoáng RE là nền môi trường nuôi cấy phù hợp nhất cho sinh trưởng của chồi lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo *in vitro* sau 30 ngày. Nồng độ 0,1% than hoạt tính là tối ưu cho quá trình tạo cây hoàn chỉnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chu C., Yin H., Xia L., Cheng D., Yan J. & Zhu L. (2014). Discrimination of *Dendrobium officinale* and its common adulterants by combination of normal light and fluorescence microscopy. *Molecules*, 19(3): 3718-3730.
- Đặng Thị Thanh Tâm, Trần Thị Thu Hương, Nguyễn Thị Lâm Hải, Nguyễn Thanh Hải & Đinh Trường Sơn (2021). Ảnh hưởng của một số dịch nghiền hữu cơ đến sự kéo dài chồi *in vitro* cây lan hoàng thảo kèn (*Dendrobium luteiflorum* Lindl.). *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 19(3): 331-338.
- Đào Thị Thanh Vân & Đặng Thị Tố Nga (2008). Giáo trình hoa lan. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
- Devi H.S., Devi S.I. & Singh T.D. (2013). High frequency plant regeneration system of *Aerides odorata* Lour. through foliar and shoot tip culture. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 41(1): 169-176.
- Đỗ Tất Lợi (2003). Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học.
- Eymar E., Alegre J., Toribio M. & Lopez-Vela D. (2000). Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on *in vitro* nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 63: 57-65.
- 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 hài quý *P. hangianum perner* Gurss (Hài Hạng) thu thập ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*. 8(2): 194-201.
- Lee Y.-I., Chen M.C. & Huang C.Y. (2010). Effect of medium composition on a asymbiotic seed germination of five phalaenopsis species. *ISHS Acta Horticulturae* 878, International Orchid Symposium November 25th.
- 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 nhãn). *Tạp chí Khoa học và Phát triển*. 10(2): 263-271.
- 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): 1274-1282.
- 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: 39-45.
- Pan M.J. & Staden J.V. (1998). The use of charcoal in *in vitro* culture-A review. *Plant growth regulation*. 26: 155-163.
- Phạm Văn Lộc & Lê Thị Hoài Thương (2016). Nhân giống *in vitro* lan Hoàng thảo kèn (*Dendrobium luteiflorum* Lindl.). *Tạp chí Khoa học Công nghệ và thực phẩm*. Chuyên san CNSH&KTMT. tr. 27-33.
- Vũ Quốc Luận, Hoàng Thanh Tùng, Vũ Thị Hiền, Hoàng Đắc Khải, Đỗ Mạnh Cường, Trịnh Thị Hương, Bùi Văn Thế Vinh, Vũ Thị Tư & Dương Tấn Nhựt (2021). Ảnh hưởng của một số yếu tố lên quá trình sinh trưởng và phát triển lan thạch học tía (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) trong nuôi cấy *in vitro* và *ex vitro*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 19(2): 321-335.
- Vũ Ngọc Lan (2012). Nghiên cứu nhân giống *in vitro* không sử dụng chất điều tiết sinh trưởng và một số biện pháp kỹ thuật nuôi trồng hai loài lan bản địa (*Dendrobium nobile* Lindl., *Dendrobium chrysanthum* Lindl.) tại Hà Nội. Luận án Tiến sĩ, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.
- 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.
- Xiao L., Ng T.B., Feng Y.B., Yao T., Wong J.H., Yao R.M., Li L., Mo F.Z., Xiao Y. & Shaw P.C (2011). *Dendrobium candidum* extract increases the expression of aquaporin-5 in labial glands from patients with Sjogren's syndrome. *Phytomedicine*. 18: 194-198.