

NHÂN GIỐNG *IN VITRO* LOÀI LAN BẢN ĐỊA *DENDROBIUM NOBILE* LINDL.

Vũ Ngọc Lan*, Nguyễn Thị Lý Anh

*Viện Sinh học Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội**Email*: vnlan@hua.edu.vn*

Ngày gửi bài: 26.08.2013

Ngày chấp nhận: 15.11.2013

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhân giống *in vitro* Lan *Dendrobium nobile* Lindl. (Thạch học) nhằm mục đích để bảo tồn và phát triển loài lan quý chi Hoàng thảo, có giá trị thẩm mỹ và dược liệu cao, đang có nguy cơ tuyệt chủng. Kết quả cho thấy nguyên liệu sử dụng thích hợp là quả lan 5 tháng tuổi; môi trường gieo hạt là MS + (100ml ND + 10g saccharose + 6,0g agar)/lít môi trường. Trong nhân *in vitro* kinh điển, môi trường nhân nhanh protocorm tối ưu là KC+ (100ml ND + 10g saccharose + 6,0g agar)/lít; nhân nhanh cụm chồi tốt nhất là MS+ (100ml ND + 10g saccharose + 6,0g agar)/lít. Trong nhân *in vitro* cải tiến: nuôi cấy lỏng lắc nút bông và lỏng lắc màng thoáng khí đã tăng hệ số nhân protocorm đạt 1,9 và 2,3 lần so với nhân *in vitro* kinh điển. Nuôi cấy đặc thoáng khí giúp giảm 25% lượng saccharose bổ sung vào môi trường và tăng hệ số nhân protocorm lên gấp 1,4 lần so với nuôi cấy kinh điển. Nhân nhanh cụm chồi bằng kỹ thuật bioreactor giảm ½ thời gian nhân giống. Môi trường tối ưu tạo cây hoàn chỉnh là RE+ (10g saccharozase + 0,5g THT)/lít, cường độ ánh sáng 2300lux.

Từ khóa: *Dendrobium nobile* Lindl., quả lan, nhân nhanh, protocorm.

In vitro* Micropropagation of Wild Orchid *Dendrobium nobile* Lindl.*ABSTRACT**

Studies of micropropagation of *D. nobile* Lindl. were conducted in order to conserve and increase the genetic pool of this precious orchid species. The results showed that the suitable materials used for micropropagation were 5 month old seed capsules. The most suitable medium for germination and protocorm formation was MS + 100ml coconut juice + 10g saccharose + 6.0g agar/liter. For *in vitro* propagation by traditional method, the optimal medium for propagation of protocorms was KC + 100ml coconut juice + 10g saccharose + 6.0g agar/liter. The most appropriate medium for rapid *in vitro* propagation of shoots was MS + 100ml coconut juice + 10g saccharose + 6.0g agar/liter. For *in vitro* propagation by improved method using liquid medium and cotton buttons combined with shaking or using liquid medium and ventilative buttons (cellulose acetate) combined with shaking had increased multiplication rate of protocorms (1.9 and 2.3 fold in comparing with the control). The propagation using solid medium with ventilation buttons reduced 25% of saccharose added to medium, and increased the multiplication rate of protocorms up to 1.4 fold in comparison with propagation by the classical method. Similarly, rapid *in vitro* propagation using bioreactor reduced the time of propagation by half. The most optimal medium used regenerating intact plants of *D. nobile* was RE + 10g saccharose + 0.5g activated carbon + 6.0g agar/liter combined with light intensity of 2300lux.

Keywords: *Dendrobium nobile* Lindl., seed capsules, propagation, protocorm.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trên thế giới chi Lan Hoàng Thảo (*Dendrobium*) có khoảng 1400 loài, chủ yếu phân bố ở Đông Nam Á và các đảo thuộc Philippine, Malaysia, Indonesia, Papua New

Guinea, Đông Bắc Australia. Ở Việt Nam có 107 loài và 1 thứ, phân bố ở các vùng núi từ Bắc vào Nam và trên một số đảo ven biển (Đào Thị Thanh Vân, Đặng Thị Tố Nga, 2008). Tuy nhiên, do nhiều nguyên nhân khác nhau, đến nay nhiều loài đã bị tuyệt chủng hoặc bị đe dọa

tuyệt chủng. Một số loài nằm trong danh lục Đỏ của “Sách đỏ Việt Nam”, trong đó có loài lan Thạch học (*Dendrobium nobile* Lindl.) phân bố ở vùng trung du miền núi phía Bắc Việt Nam (Dương Đức Huyền, 2007). Để bảo tồn và phát triển loài lan quý hiếm này, không còn cách nào khác là phải tiến hành nhân giống và nuôi trồng chúng ở quy mô lớn (Nguyễn Tiến Bản, 2007; Dương Đức Huyền, 2007).

Hiện nay, một số loài lan quý hiếm bị đe dọa tuyệt chủng trong tự nhiên đã được bảo tồn nhờ phương thức nảy mầm từ hạt (Kauth, 2005) hoặc nhân nhanh *in vitro* với nguồn nguyên liệu ban đầu là hạt gieo trên môi trường MS + 15% đường saccharose + 2,0mg/l BA (Nguyễn Văn Song, 2011). Theo Lê Văn Hoàng (2008), phương pháp nuôi cấy mô là phương pháp duy nhất có thể nhân giống lan cho hệ số nhân cao, số lượng cây giống lớn và giá thành hợp lý. Tuy nhiên, cho đến nay ở nước ta, nghiên cứu nhân giống và nuôi trồng chỉ lan Hoàng thảo chủ yếu với các giống lan lai nhập nội nhằm sản xuất hoa cắt cành hay trồng chậu làm cây cảnh. Việc nhân giống bằng kỹ thuật nuôi cấy mô, đặc biệt nuôi cấy mô cải tiến (kỹ thuật nuôi cấy lỏng lác nút bông và nuôi cấy lỏng lác thoáng khí) với loài lan rừng bản địa *D. nobile* Lindl. chưa được đề cập đến (Trần Văn Huân và Văn Tích Lượm, 2007). Chính vì vậy, mục đích của nghiên cứu này là nhân nhanh quy mô công nghiệp cây giống *D. nobile* Lindl. phục vụ công tác bảo tồn và phát triển nguồn gen được liệu quý bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào kinh điển và cải tiến trong các môi trường không sử dụng chất điều tiết sinh trưởng nhân tạo.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu được đưa vào nuôi cấy mô là chồi mầm và quả của những cây lan rừng thuộc loài *Dendrobium nobile* Lindl. 5 tháng tuổi thu thập tại Hòa Bình, đang được nuôi trồng tại Viện Sinh học Nông nghiệp, Trường ĐH Nông Nghiệp Hà Nội (Hình 1).

Mẫu nghiên cứu là protocorm, cụm chồi, chồi. Hóa chất, vật tư thí nghiệm gồm: H₂O₂ 2%,



Hình 1. Loài lan *D. nobile* Lindl.

HgCl₂ 0,1%, than hoạt tính. Môi trường: Vacin and Went, 1949 (VW); KnudsonC, 1965 (KC); Murashige-Skoog, 1962 (MS); Robert Ernst, 1979 (RE).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Mẫu nuôi trong thời gian chiếu sáng 12h/ngày, cường độ ánh sáng 800-2.300lux, nhiệt độ phòng nuôi 25±2°C; pH môi trường 5,8. Môi trường nuôi cấy được khử trùng ở nhiệt độ 121°C; 1,5at trong 20 phút.

Hệ thống bioreactor Biostat Bplus (Sartorius sản xuất), bình nuôi có thể tích tối đa 10 lít; màng lọc thoáng khí (Cellulose Acetate, kích thước lỗ 0,2µm); Nút bông được bọc ngoài bằng mũ giấy xi măng; máy lác ngang đặt vận tốc 200 vòng/phút, cường độ chiếu sáng 800lux.

Các thí nghiệm được bố trí theo phương pháp nuôi cấy mô quy chuẩn thông hành, khối hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại. Một công thức bố trí 15 bình thủy tinh dung tích 250ml. Riêng thí nghiệm về ảnh hưởng của các phương thức nuôi cấy đến khả năng nhân nhanh cụm chồi, môi trường nuôi cấy gồm MS + (100ml ND+60g chuối chín + 30g saccaroza)/lít (đối chứng) và 4 công thức: Công thức 1, 2 và 3: 80ml môi trường nhân chồi/bình, 05 bình/công thức, 03 cụm/bình, 15 chồi/cụm, màng lọc thoáng khí cellulose acetate. Công thức 4: 03 lần nhắc lại, 04 lít môi trường nhân chồi/bình, 150 cụm/bình, 15 chồi/cụm. Hệ thống bioreactor ở chế độ cánh khuấy tròn 200 vòng/phút, cường độ chiếu sáng 800lux.

Các chỉ tiêu theo dõi thông thường trong nuôi cấy mô, chỉ tiêu tỷ lệ mẫu nhiễm, tỷ lệ mẫu sống, tỷ lệ mẫu phát sinh protocorm, số chồi/cụm, hệ số nhân chồi, đường kính cụm chồi, hình thái chồi, số lượng protocorm/cụm, hệ số nhân protocorm, chiều cao cây, số lá, số rễ.

Các số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm IRRISTAT 5.0 và Excel 2003.

Địa điểm nghiên cứu: Viện Sinh học Nông nghiệp, Trường Đại Học Nông Nghiệp Hà Nội, Trâu Quỳ, Gia Lâm, Hà Nội và Học viện Hậu Cần, Ngọc Thụy, Gia Lâm, Hà Nội.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khử trùng cơ quan nuôi cấy tạo nguồn vật liệu *in vitro*

3.1.1. Khử trùng chồi mầm lan

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, mặc dù các công thức khử trùng được bố trí theo cấp độ tăng dần tác động của hóa chất vào mẫu cấy nhưng hiệu quả thu được sau 6 tuần theo dõi không tỷ lệ thuận. Ở CT3 cho tỷ lệ mẫu sống cao nhất cũng chỉ đạt 8,89%. Nguồn mẫu sạch thu được từ chồi lan rất hạn chế, do tỷ lệ nhiễm cũng như tỷ lệ mẫu chết cao, có thể do nhiều nguyên nhân khác nhau. Chính vì vậy, chúng tôi phải sử dụng nguồn mẫu quả lan, để đưa vào nuôi cấy *in vitro*.

Bảng 1. Ảnh hưởng của phương pháp khử trùng đến khả năng sống của chồi mầm

| Công thức thí nghiệm | Tỷ lệ mẫu chết (%) | Tỷ lệ mẫu nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu sống (%) |
|---|--------------------|---------------------|--------------------|
| CT1 (H ₂ O ₂ 2% kép, lần 1: 5 phút, lần 2: 2 phút) | 23,33 | 72,23 | 4,44 |
| CT2 (Lần 1 trong H ₂ O ₂ 2% 5 phút, lần 2: HgCl ₂ 0,1% 1 phút) | 61,11 | 36,67 | 2,22 |
| CT3 (HgCl ₂ 0,1% kép, lần 1: 3 phút, lần 2: 1 phút) | 37,78 | 53,33 | 8,89 |

Bảng 2. Ảnh hưởng phương pháp khử trùng đến tỷ lệ mẫu sống và nảy mầm của hạt lan

| Công thức | Tỷ lệ mẫu sống và phát sinh protocorm (%) | Tỷ lệ mẫu sống và phát sinh chồi (%) |
|---|---|--------------------------------------|
| CT1 (Nhúng quả trong cồn 96%, đốt trên lửa đèn cồn) | 97 | 3 |
| CT2 (Nhúng cồn 96%+H ₂ O ₂ (2%) 5 phút) | 96 | 4 |
| CT3 (Nhúng cồn 96%+HgCl ₂ (0,1%) 5 phút) | 97 | 3 |

Shu Fung Lo và cộng sự (2004) đã công bố khử trùng quả lan trong cồn 96% và gieo hạt trên môi trường nuôi cấy đặc hoặc trên MS+3% saccharose không có chất điều tiết sinh trưởng hoặc trên ½ MS + 0,2 mg/lít αNAA.

3.1.2. Khử trùng quả lan

Cả 3 công thức đều cho kết quả tối ưu trên nền môi trường MS (+ 100ml ND + 10g saccharose + 6g agar)/lít. Tuy nhiên, xét hiệu quả các công đoạn thao tác thì CT1 là tốt nhất. Sau 6 tuần nuôi cấy, có 97% hạt phát sinh protocorm và 3% nảy cụm chồi (Bảng 2).

3.2. Nhân nhanh protocorm và cụm chồi theo phương pháp *in vitro*

3.2.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng nhân nhanh protocorm và cụm chồi

Kết quả nhân nhanh protocorm (Bảng 3) cho thấy, sau 8 tuần nuôi cấy, các công thức thí nghiệm đều có sự khác nhau về giá trị của các chỉ tiêu nghiên cứu. Trong đó, trên nền môi trường KC, các chỉ tiêu theo dõi như đường kính cụm protocorm (2,26 cm), số lượng protocorm/cụm (210,06) và hệ số nhân - HSN (4,2 lần/8 tuần) có giá trị cao hơn các công thức môi trường khác ở độ tin cậy 95%. Mặt khác, xét hiệu quả kinh tế, KC là môi trường rẻ tiền và thông dụng trong nuôi cấy lan, vì vậy môi trường KC + (100ml nước dừa (ND)+10g saccarosa+6g agar)/lít được lựa chọn trong nuôi cấy nhân nhanh protocorm loài lan *D. nobile*.

Bảng 3. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng nhân nhanh protocorm (sau cấy 8 tuần)

| Công thức | Đường kính cụm (cm) | | Số lượng protocorm/cụm | | HSN protocorm (lần) |
|---------------------|---------------------|----------------|------------------------|----------------|---------------------|
| | Ngày cấy mẫu | Sau cấy 8 tuần | Ngày cấy mẫu | Sau cấy 8 tuần | |
| VW | 0,5 | 1,85 | 50 | 176,32 | 3,53 |
| KC | 0,5 | 2,26 | 50 | 210,06 | 4,20 |
| MS | 0,5 | 2,10 | 50 | 190,53 | 3,81 |
| RE | 0,5 | 1,84 | 50 | 166,48 | 3,33 |
| LSD _{0,05} | | 0,1 | | 3,6 | 0,1 |
| CV (%) | | 3,8 | | 4,0 | 4,0 |

Số chồi trung bình (TB)/cụm) và HSN chồi là khác nhau ở các CT môi trường khác nhau. Nên môi trường MS là tốt nhất cho HSN chồi (đạt 3,08 lần/8 tuần) và RE là thấp nhất (2,69 lần/8 tuần) (Bảng 4). Đối với lan *Vanda dearei* và *Cymbidium findlaysonianum* sự sinh trưởng của PLB tốt nhất là trên môi trường MS sau đó đến môi trường KC và VW (Tawaro et al., 2008). Như vậy, môi trường MS + (100ml ND + 10g saccharose + 6g agar)/lít phù hợp nhất trong quá trình nhân nhanh cụm chồi *D. nobile*.

3.2.2. Ảnh hưởng của phương thức nuôi cấy sử dụng nút bông đến khả năng nhân nhanh protocorm

Kết quả ở bảng 5 cho thấy, cùng sử dụng nút bông trong nuôi cấy nhưng ở môi trường lỏng lác cho kết quả nhân nhanh protocorm tốt nhất, làm tăng hiệu quả trong nhân nhanh protocorm: số lượng protocorm/cụm là 105, khối

lượng protocorm 45mg và HSN 2,10 lần/3tuần nuôi cấy. Mặt khác, nuôi cấy trong môi trường lỏng lác sẽ tiết kiệm được môi trường do lượng môi trường sử dụng ít, không sử dụng agar, tiết kiệm điện năng so với nuôi cấy trong môi trường đặc.

3.2.3. Ảnh hưởng của phương thức nuôi cấy sử dụng nút màng thoáng khí đến khả năng nhân nhanh protocorm

Kết quả cho thấy, việc sử dụng nút màng thoáng khí trong nuôi cấy mô đã làm tăng HSN và tăng khối lượng protocorm. Đặc biệt trong nuôi cấy thoáng khí lỏng lác (CT3) đã nâng cao HSN vượt bậc (số lượng protocorm/cụm là 142, khối lượng protocorm 45,7mg, HSN 2,84 lần/3 tuần) (Bảng 6). Kết quả này đồng thời cho thấy, HSN protocorm của công thức nuôi cấy lỏng lác màng lọc thoáng khí cao hơn và có hiệu quả hơn so với công thức lỏng lác nút bông.

Bảng 4. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng nhân nhanh cụm chồi

| Công thức | Số chồi TB/cụm | | HSN chồi (lần) sau cấy 8 tuần |
|---------------------|----------------|----------------|-------------------------------|
| | Ngày cấy mẫu | Sau cấy 8 tuần | |
| VW | 15,00 | 43,70 | 2,91 |
| KC | 15,00 | 45,40 | 3,03 |
| MS | 15,00 | 47,13 | 3,08 |
| RE | 15,00 | 40,38 | 2,69 |
| LSD _{0,05} | | 2,36 | 0,03 |
| CV (%) | | 4,0 | 4,1 |

Bảng 5. Ảnh hưởng của phương thức nuôi cấy nút bông đến khả năng nhân nhanh protocorm (sau 3 tuần nuôi cấy)

| Công thức | Số lượng TB protocorm/cụm | Khối lượng TB protocorm (mg) | HSN protocorm (lần) |
|---------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------|
| ĐC+đặc | 54 | 24 | 1,08 |
| ĐC+lông tnh | 38 | 18 | 0 |
| ĐC+lông lác | 105 | 45 | 2,10 |
| LSD _{0,05} | 7,01 | 1,40 | 0,19 |
| CV (%) | 5,10 | 2,30 | 4,90 |

Bảng 6. Ảnh hưởng của phương thức nuôi cấy thoáng khí đến khả năng nhân nhanh protocorm (sau 3 tuần nuôi cấy)

| Công thức | Số lượng TB protocorm/cụm | Khối lượng TB protocorm (mg) | HSN protocorm (lần) |
|---------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------|
| CT1: ĐC+đặc | 62 | 25,0 | 1,24 |
| CT2:ĐC+lông tnh | 46 | 18,8 | 0 |
| CT3:ĐC+lông lác | 142 | 45,7 | 2,84 |
| LSD _{0,05} | 5,11 | | 0,35 |
| CV (%) | 2,3 | | 2,80 |

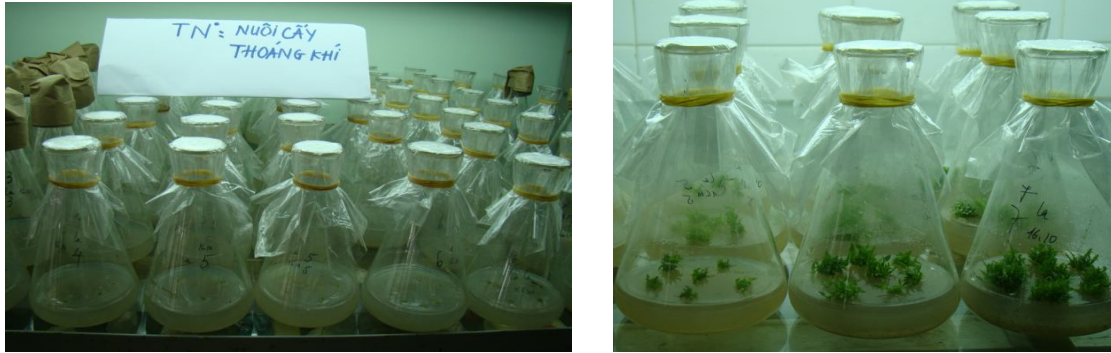
3.2.4. Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến quá trình nhân nhanh protocorm trong nuôi cấy đặc thoáng khí

Sau 8 tuần nuôi cấy trong nền môi trường đặc và sử dụng nút màng thoáng khí (Cellulose Acetate), ở CT4 (bổ sung 7,5g saccarosa/lít) cho các chỉ tiêu nhân nhanh protocorm vượt trội so với đối chứng và các công thức thí nghiệm khác

(318,3 protocorm/cụm, HSN đạt 6,37 lần/8 tuần nuôi cấy) (Bảng 7 và Hình 2). Như vậy, nuôi cấy trong môi trường đặc thoáng khí đã cải thiện HSN protocorm từ 4,47 lần khi sử dụng nút bông trong nuôi cấy kinh điển lên 6,37 lần khi thay thế nút bông bằng nút màng lọc thoáng khí, đồng thời nâng cao hiệu quả nhân giống do đã giảm 25% hàm lượng saccharose.

Bảng 7. Ảnh hưởng của hàm lượng đường saccharose đến khả năng nhân nhanh protocorm trong nuôi cấy đặc thoáng khí (sau 8 tuần nuôi cấy)

| Công thức | Số lượng TB protocorm/cụm | Khối lượng TB protocorm (mg) | HSN protocorm (lần) |
|-------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------|
| CT1: ĐC | 52,0 | 21,5 | 1,04 |
| CT2: ĐC+2,5g saccharose | 165,5 | 22,4 | 3,31 |
| CT3: ĐC+5,0g saccharose | 201,7 | 23,0 | 4,04 |
| CT4: ĐC+7,5g saccharose | 318,3 | 22,8 | 6,37 |
| CT5: ĐC+10g saccharose | 96,7 | 22,0 | 1,93 |
| LSD _{0,05} | 5,11 | | 0,14 |
| CV (%) | 2,3 | | 2,3 |



Hình 2. Nuôi cấy thoáng khí trong môi trường đặc lan *D. nobile*

3.2.5. Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến quá trình nhân nhanh protocorm trong nuôi cấy lỏng lác thoáng khí

Kết quả sau 4 tuần nuôi cấy trong nền môi trường lỏng lác và sử dụng nút màng thoáng khí CA, các công thức bổ sung saccharose đều có hiệu quả trong nuôi cấy mô làm tăng HSN và tăng khối lượng protocorm (Bảng 8). Đặc biệt, nuôi cấy thoáng khí trong môi trường lỏng lác đã nâng cao HSN vượt bậc, tăng hiệu quả, giảm giá thành do giảm chi phí môi trường nuôi cấy, giảm hàm lượng saccharose và giảm thời gian nuôi cấy. Công thức tối ưu (CT4) cho nhân nhanh protocorm là bổ sung 7,5g saccharose (ở mức tin cậy 95% HSN protocorm đạt 4,09 lần/4 tuần) (Bảng 8).

3.2.6. Ảnh hưởng của các phương thức nuôi cấy đến khả năng nhân nhanh cụm chồi

Kết quả ở bảng 9 cho thấy, có sự sai khác rõ rệt về các chỉ tiêu số lượng chồi TB/cụm, HSN

chồi/4 tuần giữa các CT thí nghiệm. CT4 sử dụng hệ thống bioreactor cho nhân nhanh cụm chồi, số lượng chồi TB/cụm cao nhất đạt 51 chồi trong khi CT3, CT1 và CT2 chỉ đạt lần lượt là: 34, 28 và 18 chồi (Bảng 9). Căn cứ vào độ tin cậy 95% đánh giá đến chỉ tiêu HSN chồi/4 tuần thì CT4 là công thức tốt nhất so với CT1, CT2 (3,4 lần/4 tuần/CT4; 2,26 lần/4 tuần/CT3 và 1,86 lần/4 tuần/CT1; 1,20 lần/4 tuần/CT2).

Như vậy, đối với loài *D. nobile* để nhân nhanh cụm chồi nên lựa chọn nuôi cấy bioreactor (nếu có sẵn thiết bị) hoặc nuôi cấy lỏng lác thoáng khí trong môi trường MS + (100ml ND + 60g chuối chín + 30g saccharose)/lít.

3.3. Tạo cây hoàn chỉnh

3.3.1. Ảnh hưởng của nền môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng của chồi

Với mục đích tạo cây con có sức sống cao đạt tiêu chuẩn ra cây cần lựa chọn môi trường thích

Bảng 8. Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến khả năng nhân nhanh protocorm trong nuôi cấy lỏng lác thoáng khí (Sau 4 tuần nuôi cấy)

| Công thức | Số lượng TB protocorm/cụm | Khối lượng TB protocorm (mg) | HSN protocorm (lần) |
|-------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------|
| CT1: ĐC | 108,6 | 40,8 | 2,17 |
| CT2: ĐC+2,5g saccharose | 112,8 | 38,8 | 2,26 |
| CT3: ĐC+5,0g saccharose | 136,3 | 42,6 | 2,73 |
| CT4: ĐC+7,5g saccharose | 204,7 | 43,7 | 4,09 |
| CT5: ĐC+10g saccharose | 68,5 | 39,1 | 1,37 |
| LSD _{0,05} | 13,73 | | 0,28 |
| CV (%) | 4,5 | | 4,0 |

Bảng 9. Ảnh hưởng của phương thức nuôi cấy đến khả năng nhân nhanh cụm chồi (sau 4 tuần nuôi cấy)

| Công thức | Số lượng chồi TB/cụm | HSN chồi (lần) | Hình thái chồi |
|---|----------------------|----------------|-----------------|
| CT1: Nền ĐC nuôi cấy đặc+thoáng khí | 28 | 1,86 | mập, xanh |
| CT2: Nền ĐC nuôi cấy lỏng tĩnh+thoáng khí | 18 | 1,20 | mập, xanh trắng |
| CT3: Nền ĐC nuôi cấy lỏng lác+thoáng khí | 34 | 2,26 | mập, xanh mờ |
| CT4: Nền ĐC nuôi cấy bioreactor | 51 | 3,40 | mập, xanh mờ |
| LSD _{0,05} | 2,8 | 0,16 | |
| CV (%) | 3,7 | 3,8 | |

Bảng 10. Ảnh hưởng của loại môi trường đến sinh trưởng chồi (sau 6 tuần nuôi cấy)

| Công thức | Chiều cao (cm) | | Số lá/cây | | Số rễ/cây |
|---------------------|----------------|----------------|--------------|----------------|-----------|
| | Ngày cấy mẫu | Sau cấy 6 tuần | Ngày cấy mẫu | Sau cấy 6 tuần | |
| CT1: VW | 3,5 | 4,47 | 3,0 | 4,11 | 2,29 |
| CT2: KC | 3,5 | 3,68 | 3,0 | 3,29 | 2,56 |
| CT3: MS | 3,5 | 3,87 | 3,0 | 4,16 | 3,37 |
| CT4: RE | 3,5 | 4,88 | 3,0 | 4,44 | 3,69 |
| LSD _{0,05} | | 0,38 | | 0,29 | 0,03 |
| CV (%) | | 4,7 | | 3,8 | 5,3 |

hợp nhất cho sinh trưởng của chồi lan. Các chồi thu được từ các thí nghiệm trên được tách riêng và cấy trên các môi trường khác nhau, 4 công thức/môi trường, 3 bình/công thức, 3 chồi/bình, chồi có chiều cao 3cm + 3 lá. Qua bảng 10, ở mức tin cậy 95%, CT4 - sử dụng nền môi trường RE - đạt các chỉ tiêu liên quan đến sinh trưởng chồi (chiều cao cây, số lá, số rễ) cao nhất, hơn hẳn các công thức thí nghiệm khác (chiều cao cây 4,88 cm/cây; 4,44 lá/cây; 3,69 rễ/cây). Như vậy, nền môi trường phù hợp nhất cho sinh trưởng chồi của *D. nobile* là RE.

3.3.2. Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng tới sinh trưởng của chồi

Ánh sáng trong nuôi cấy mô thực vật là ánh sáng nhân tạo, cường độ ánh sáng 1000~5000 lux, 16h chiếu sáng. Để chồi loài lan rừng *in vitro* phát triển hoàn chỉnh thì cần điều chỉnh cường độ ánh sáng thích hợp. Trong 4 công thức với những dải cường độ ánh sáng khác nhau

trong cùng chu kỳ chiếu sáng. Ở CT4, chồi *D. nobile* được nuôi cấy ở cường độ chiếu sáng 2300 lux đã giúp cây phát triển mạnh nhất (lá mở to, màu xanh sẫm, bóng; thân mập; bộ rễ phát triển mạnh) (Bảng 11, Hình 3).

3.3.3. Ảnh hưởng của than hoạt tính (THT) đến khả năng sinh rễ của chồi

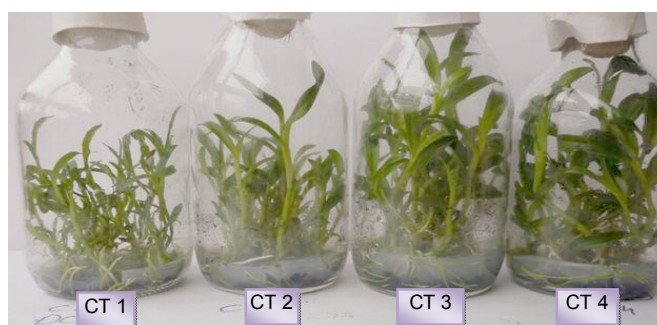
Sau 30 ngày nuôi cấy, ở CT2 (bổ sung 0,5g THT/lít môi trường), chồi mập, rễ nhiều nhất (3,46/cây) và số rễ nhiều hơn hẳn các công thức khác ở mức tin cậy 95% (Bảng 12). Tuy nhiên, khi bổ sung tăng dần lượng THT thì chiều cao cây lại theo xu thế giảm dần, điều này có thể do THT ở nồng độ cao đã hấp phụ một số chất điều tiết sinh trưởng tự nhiên và dinh dưỡng nên làm giảm tốc độ sinh trưởng của cây. Vậy, môi trường tối ưu tạo cây hoàn chỉnh cho lan *D.nobile* là: RE + (10g saccharose+0,5g THT+6g agar)/lít, cường độ ánh sáng 2300lux.

Nhân giống *in vitro* loài lan bản địa *Dendrobium nobile* Lindl.

Bảng 11. Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng đến sinh trưởng chồi

| Công thức | Chiều cao TB/cây (cm) | | Số lá TB/cây | | Số rễ TB/cây |
|------------------------|-----------------------|----------------|--------------|----------------|--------------|
| | Ngày cấy mẫu | Sau cấy 6 tuần | Ngày cấy mẫu | Sau cấy 6 tuần | |
| CT1: ĐC+1 đèn =800lux | 3,5 | 3,87 | 3,0 | 3,27 | 3,09 |
| CT2: ĐC+2 đèn =1300lux | 3,5 | 4,18 | 3,0 | 3,44 | 3,24 |
| CT3: ĐC+3 đèn =1800lux | 3,5 | 4,37 | 3,0 | 3,67 | 3,58 |
| CT4: ĐC+4 đèn =2300lux | 3,5 | 4,88 | 3,0 | 4,16 | 4,08 |
| LSD _{0,05} | | 0,27 | | 0,27 | 0,26 |
| CV (%) | | 3,4 | | 3,9 | 3,9 |

Ghi chú: ĐC = Nền môi trường RE + (10g saccharose+6g agar)/lít



Hình 3. Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng đến sinh trưởng của chồi lan *D. nobile*

Bảng 12. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng tạo rễ của chồi (sau 30 ngày nuôi cấy)

| Công thức | Tỷ lệ tạo rễ (%) | Số rễ TB/cây | Chiều dài rễ TB (cm) | Hình thái rễ |
|---------------------|------------------|--------------|----------------------|-----------------------------|
| ĐC | 80,00 | 3,02 | 1,27 | vừa, trắng ngà |
| ĐC+0,5g THPT | 100,00 | 3,46 | 2,12 | mập, tròn, trắng |
| ĐC+1,0g THPT | 100,00 | 3,22 | 2,03 | gầy, có lông tơ |
| ĐC+1,5g THPT | 100,00 | 3,09 | 2,30 | gầy, dẹt, nhiều lông tơ |
| ĐC+2,0g THPT | 100,00 | 2,91 | 2,54 | gầy, dẹt, rất nhiều lông tơ |
| LSD _{0,05} | | 0,25 | 0,26 | |
| CV (%) | | 3,9 | 5,8 | |

Ghi chú: ĐC = Nền môi trường RE + (10g saccharose+6g agar)/lít

4. KẾT LUẬN

Nguồn vật liệu ban đầu là quả lan. Khử trùng tối ưu là nhúng quả trong cồn 96% rồi đốt trên ngọn lửa đèn cồn. Môi trường gieo hạt thích hợp là: MS + (100ml nước dừa + 10g saccharose+6g agar)/lít môi trường.

Nhân nhanh *in vitro* bằng nuôi cấy mô kinh điển: Môi trường nhân nhanh protocorm tối ưu là KC + (100ml nước dừa + 10g saccarosa + 6g agar)/lít; HSN 4,2 lần/8 tuần nuôi cấy. Môi trường nhân nhanh cụm chồi tốt nhất là MS + (100ml ND+10g saccharose+6g agar)/lít, HSN chồi 3,08 lần/8 tuần nuôi cấy.

Nhân nhanh *in vitro* nhờ nuôi cấy mô cải tiến: kỹ thuật nuôi cấy lỏng lắc nút bông và nuôi cấy lỏng lắc thoáng khí đã tăng HSN protocorm đạt 1,9 và 2,3 lần so với đối chứng. Nuôi cấy đặc, màng lọc thoáng khí làm giảm 25% lượng saccharose bổ sung vào môi trường nuôi cấy và tăng HSN protocorm lên gấp 1,4 lần so với nuôi cấy kinh điển. Nhân nhanh cụm chồi bằng kỹ thuật bioreactor giảm thời gian nhân giống và cải thiện chất lượng chồi.

Môi trường tối ưu tạo cây hoàn chỉnh là RE +(10g saccharose+0,5g than hoạt tính)/lít, cường độ ánh sáng 2.300lux.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Tiến Bản và nhiều tác giả (2007). Sách Đỏ Việt Nam, Phần Thực vật; NXB. Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.
- Lê Văn Hoàng (2008). Giáo trình nuôi cấy mô tế bào thực vật. Đại học Đà Nẵng
- Trần Văn Huân, Văn Tích Lượm (2007). Kỹ thuật nuôi trồng cây lan. NXB thành phố Hồ Chí Minh.
- Dương Đức Huyền (2007). Thực vật chí Việt Nam, 9-Họ lan (*Orchidaceae*). NXBKH Kỹ thuật
- Nguyễn Văn Song (2011). Nhân nhanh *in vitro* lan Kim Điệp (*Dendrobium chrysotoxum*)-một loài lan rừng có nguy cơ tuyệt chủng. Tạp chí khoa học ĐH Huế 64:127-136.
- Đào Thị Thanh Vân, Đặng Thị Tố Nga (2008). Giáo trình hoa lan. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
- Kauth P. (2005). *In vitro* seed germination and seedling development of *Calopogon tuberosus* and *Sacoila lanceolata* var. *lanceolata*: Two Florida native terrestrial orchids. Master thesis, University of Florida
- Kusumoto and Furukawa (1977). Effect of Organic Matter on the Growth of *Cymbidium* Protocorms Cultured *in vitro*, Japan. Soc. Hort. Sci. 45 (4): 421-426.
- Shu Fung Lo, Satish Manohar Nalawade, Chao Lin Kuo, Chung Li Cheng and Hsin Sheng Tsay (2004). Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and ex vitro establishment of plants of *Dendrobium tosaense makino*-a medicinally important orchid, *In vitro* Cellular and Developmental Biology - Plant 40 (5): 528-535.
- Tawaro Supavadee, Suraninpong Potjamarn and Chanprame Sontichai (2008). Germination and Regeneration of *Cymbidium findlaysonianum* Lindl. on a Medium Supplemented with Some Organic Sources. Walailak J Sci & Tech 5 (2): 125-135.