

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* LAN TRẦM TÍM (*Dendrobium nestor*)

Vũ Thị Phan¹, Khuất Thị Hải Ninh², Nguyễn Thị Tho³

^{1,2,3}Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Nhân giống cây lan Trầm tím (*Dendrobium nestor*) bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* đã được nghiên cứu thành công. Kết quả cho thấy, khử trùng quả lan bằng phương pháp đốt 3 lần bằng cồn 96⁰ cho tỷ lệ nảy mầm 90,8% sau 8 tuần nuôi cấy. Nhân nhanh thể chồi trên môi trường MS bổ sung 0,4 mg/l BAP; 0,2 mg/l NAA; 0,2 mg/l Kinetin; 30g/l sucrose; 5,5 g/l agar, hệ số nhân đạt 6,33 lần sau 6 tuần nuôi cấy. Kích thích tăng trưởng chồi bằng môi trường nhân nhanh thể chồi bổ sung 100 mg/l khoai tây cho hệ số nhân chồi là 4,12 lần, chiều cao chồi đạt 4,23 cm, thân mập lá dài và xanh. Ra rễ trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l IBA; 0,1 mg/l NAA; 20 g/l sucrose 6,5 g/l agar với tỷ lệ ra rễ 100%; số rễ trung bình đạt 5,45 rễ/cây và chiều dài rễ trung bình là 3,85 cm. Cây con hoàn chỉnh được huấn luyện 2 tuần trước khi ra ngôi, sau đó trồng cây trên giá thể dớn trắng cho tỉ lệ sống 93,33%, cây khỏe, thân cứng, rễ bám tốt vào giá thể và xuất hiện lá mới sau 8 tuần. Quy trình nhân giống có thể áp dụng để sản xuất hàng loạt cây giống lan Trầm tím chất lượng tốt, đáp ứng nhu cầu nguồn cây giống hiện nay.

Từ khóa: BAP, *in vitro*, lan Trầm tím, nhân giống, ra rễ, thể chồi.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan Trầm tím (*Dendrobium nestor*) thuộc chi *Dendrobium* là một giống lan lai tạo giữa lan Phi điệp (*Dendrobium anosmum*) và lan Hoàng thảo tím (*Dendrobium parishii*) thuộc chi *Dendrobium*. Lan Trầm tím có hoa rất đẹp, chu kỳ hoa dài, hoa tươi lâu, dáng cong buông thõng mùi thơm nhẹ dễ chịu như hương trầm; có màu tím hồng rất đẹp. Trong tự nhiên nhân giống hoa lan chủ yếu bằng con đường sinh sản sinh dưỡng từ vật liệu thân, cành. Nhưng nhân giống bằng hình thức sinh dưỡng thường cho hệ số nhân giống thấp và ảnh hưởng lớn đến cây mẹ. Mặt khác, hạt lan trong tự nhiên rất khó nảy mầm vì hạt không chứa nội nhũ nên khả năng nhân giống hữu tính không khả thi. Để giải quyết vấn đề trên, kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào đã được áp dụng, bởi nhân giống bằng phương pháp này cho hệ số nhân cao, có thể tạo được hàng loạt cây giống có sức sinh trưởng tốt, cây giống đồng đều và không phụ thuộc mùa vụ.

Hiện nay, trên thế giới và ở Việt Nam có nhiều nghiên cứu về nhân giống *in vitro* chi *Dendrobium* đã được thực hiện như Sana Asghar và cộng sự (2011); Lita Soetopo và cộng sự (2012); Jaime A và cộng sự (2015); Edy Setiti và cộng sự (2017), Nguyễn Văn Kết (2010); Vũ Kim Dung và cộng sự (2016),

Nguyễn Văn Việt (2017), nhưng các nghiên cứu về nhân giống lan Trầm tím còn rất hạn chế.

Bài báo này, công bố kết quả nghiên cứu nhân giống *in vitro* lan Trầm tím đạt hiệu quả cao nhằm góp phần vào công tác bảo tồn nguồn gen và nhân giống phục vụ thương mại hóa loài lan có giá trị thẩm mỹ cao này.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu tươi: Quả lan Trầm tím chín sinh lý đến 80%, được thu hái từ vườn lan Vân Anh - Hoài Đức - Hà Nội.

Môi trường dinh dưỡng: Các hóa chất pha môi trường MS; bổ sung chất hữu cơ (Chuối xanh và Khoai tây có hàm lượng 50 - 150 g/l).

Chất kích thích sinh trưởng thực vật: BAP; Kinetin; NAA; IBA; NAA.

Chất khử trùng: HgCl₂ 0,1%; cồn 96⁰.

Vật liệu trồng lan: xơ dừa (100%), vỏ thông (50%), xơ dừa (50%), dớn trắng (100%).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp nghiên cứu chung

Sử dụng quả lan làm nguồn vật liệu khởi đầu, tiến hành khử trùng và cấy hạt trên môi trường dinh dưỡng cơ bản MS. Khi hạt nảy mầm chuyển sang môi trường có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng để nghiên cứu nhân nhanh thể chồi. Khi chồi có số lá 2 - 3 lá thì chuyển sang môi trường nhân nhanh kích thích

tăng trưởng chồi. Khi chồi cao 4 - 5 cm, có 3 - 4 lá cây chuyển sang môi trường kích thích tạo rễ, những cây không đủ kích thước thì tiếp tục cấy chuyển sang môi trường nhân nhanh kích thích tăng trưởng chồi. Cây lan hoàn chỉnh được huấn luyện 2 tuần trước khi trồng ngoài vườn ươm trên các giá thể.

Các môi trường nuôi cấy được chỉnh pH = 5,8, sau đó khử trùng ở 118⁰C trong thời gian 20 phút.

Các mẫu cây được nuôi ở điều kiện ánh sáng đèn huỳnh quang 12 giờ/ngày, cường độ 2000 - 3000 lux, nhiệt độ 24 ± 2⁰C. Các thí nghiệm được bố trí đồng nhất và chỉ thay đổi yếu tố nghiên cứu.

Bố trí công thức thí nghiệm: 90 mẫu/công thức, 30 mẫu/lần lặp.

2.2.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Khử trùng mẫu: Quả lan Trầm tím đã chín sinh lý, không bị nứt vỡ, được rửa sạch dưới vòi nước, sau đó dùng khăn sạch lau khô, dùng bông tăm còn 70⁰ nhẹ nhàng lau sạch bề mặt quả lan. Sau đó khử trùng quả bằng 2 cách: 1) khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% với thời gian khác nhau (3, 5 và 7 phút); 2) khử trùng bằng cách nhúng quả lan vào cồn 96⁰ rồi đốt trên ngọn lửa đèn cồn (đến khi cồn bám vào quả lan được cháy hết) thực hiện thao tác trên với số lần 1, 2, 3 và 4 lần. Sau khi khử trùng, tách vỏ quả và cấy hạt trên môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung 30 g/l sucrose; 5,5 g/l agar. Chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ bình mẫu sạch (%), tỷ lệ bình nảy chồi (%), thu thập số liệu sau 8 tuần nuôi cấy.

Nhanh thể chồi: Cây chuyển thể chồi sang môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung 0,2 mg/l Kinetin; 0,2 mg/l NAA; 0,2 - 0,8 mg/l BAP; 30 g/l sucrose; 5,5 g/l agar.

Thể chồi được cấy theo cụm (20 thể chồi/cụm), chỉ tiêu theo dõi là: hệ số nhân nhanh thể chồi (lần); chất lượng thể chồi, thời gian theo dõi là 6 tuần.

Kích thích tăng trưởng chồi: Sử dụng công thức môi trường bổ sung chất điều hòa sinh trưởng cho kết quả tốt nhất ở thí nghiệm trên, bổ sung rễ hoặc kết hợp chuối xanh và khoai

tây với hàm lượng 50 - 150 g/l để nghiên cứu đến khả năng tăng trưởng chồi. Thời gian theo dõi là 8 tuần đối với các chỉ tiêu về: hệ số nhân chồi, chiều cao chồi, chất lượng chồi.

Tạo cây hoàn chỉnh: Chồi đạt tiêu chuẩn khi có 4 - 5 lá, cao 3 - 4 cm được cấy chuyển trên môi trường ra rễ là môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung 20 g/l sucrose; 6,5 g/l agar; 0,3 - 0,7 mg/l IBA; 0,1 mg/l NAA. Thời gian theo dõi là 6 tuần đối với các chỉ tiêu về số chồi ra rễ, số lượng rễ, chiều dài rễ.

Trồng cây lan in vitro ngoài vườn ươm: Cây con hoàn chỉnh có chiều cao 4 - 5 cm, rễ mập, 5 - 6 rễ/cây huấn luyện dưới ánh sáng tán xạ khoảng 2 tuần. Sau đó, rửa sạch rễ cây lan và cấy vào các loại giá thể khác nhau: 100% xơ dừa, 50% xơ dừa, 50% vỏ thông và 100% dớn trắng. Thời gian thu thập số liệu là 8 tuần với các chỉ tiêu theo dõi là số cây sống, chất lượng cây.

2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

So sánh kết quả giữa các công thức thí nghiệm về tỉ lệ mẫu sạch, tỉ lệ mẫu tạo cụm chồi, tỉ lệ chồi ra rễ bằng tiêu chuẩn khi bình phương (χ^2). So sánh giữa các công thức thí nghiệm về số lượng chồi/cụm, chiều dài chồi, chiều dài rễ và số lượng rễ/cây bằng phân tích phương sai một nhân tố.

Số liệu đã thu thập được xử lý bằng phần mềm SPSS (Nguyễn Hải Tuất và Nguyễn Trọng Bình, 2005) và phần mềm Excel.

2.3. Địa điểm nghiên cứu

Thí nghiệm được tiến hành tại phòng nuôi cấy mô - tế bào thực vật của Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của các phương pháp khử trùng đến khả năng tạo mẫu sạch và nảy mầm

Quả lan sau khi làm sạch được khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% với thời gian khác nhau và khử trùng bằng nhúng cồn rồi đốt trên ngọn lửa đèn cồn với số lần khác nhau (1, 2, 3 và 4 lần). Kết quả tạo mẫu sạch lan Trầm tím được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của phương pháp khử trùng đến khả năng tạo mẫu sạch và nảy chồi

CTTN	Khử trùng bằng HgCl ₂ 0,1% (phút)	Đốt bằng cồn 96 ⁰ (lần)	Tổng số bình vào mẫu (bình)	Bình mẫu sạch		Bình mẫu sạch nảy mầm	
				n	%	n	%
CT ₁	3		76	58	76,3	50	65,8
CT ₂	5	0	75	68	90,6	54	72,0
CT ₃	7		67	62	92,5	37	55,2
CT ₄			72	28	38,9	25	34,7
CT ₅	0	2	70	44	62,9	38	54,3
CT ₆		3	76	73	96,1	69	90,8
CT ₇		4	70	67	97,1	52	74,3
Sig				0,0001		0,0001	

Kết quả ở bảng 1 cho thấy các công thức khử trùng quả lan Trâm tím khác nhau đã có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tạo mẫu sạch (Sig = 0,0001 < 0,05). Trong đó, công thức khử trùng quả lan bằng đốt cồn 3 lần cho hiệu quả tốt nhất với 96,1% bình mẫu sạch và 90,8% bình mẫu sạch nảy mầm. So sánh với kết quả của tác giả Nguyễn Quỳnh Trang và cộng sự (2013) và Nguyễn Văn Việt (2017) cũng nghiên cứu tạo mẫu sạch từ quả lan đều sử dụng HgCl₂ 0,1% trong thời gian 7 - 12 phút cho tỉ lệ mẫu sạch nảy mầm là 56,6% -

76,7%. Do vậy, có thể thấy phương pháp dùng cồn đốt quả lan cho hiệu quả rõ rệt và không gây độc cho người sử dụng. Kết quả thu được ở hình 1.a; 1.b.

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

Thí nghiệm được tiến hành trên môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung chất điều hòa sinh trưởng (BAP, Kinetin và NAA) với các nồng độ khác nhau. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ chất ĐHST đến khả năng nhân nhanh thể chồi

CTTN	Chất ĐHST (mg/l)			Hệ số nhân (lần)	Chất lượng thể chồi
	BAP	Kinetin	NAA		
ĐC	0	0	0	1,05	Thể chồi nhỏ, xanhvàng
CT ₁	0,2			3,24	Thể chồi nhỏ, xanh tốt
CT ₂	0,4			6,33	Thể chồi mập, xanh tốt
CT ₃	0,6	0,2	0,2	4,77	Thể chồi nhỏ, hơi vàng
CT ₄	0,8			4,87	Thể chồi nhỏ, hơi vàng
CT ₅	0,2			5,25	Thể mập, xanh tốt
CT ₆	0,4			4,27	Thể chồi mập, xanh tốt
CT ₇	0,6	0,3	0,2	3,78	Thể chồi nhỏ, hơi vàng
CT ₈	0,8			2,63	Thể chồi nhỏ, xanhvàng

Số liệu bảng 2 cho thấy, chất điều hòa sinh trưởng có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tạo cụm chồi của lan Trâm tím (Sig < 0,05). Môi trường bổ sung chất điều hòa sinh trưởng cho hệ số nhân chồi (2,63 - 6,33 lần) vượt xa so với đối chứng (chỉ 1,05 lần). Môi trường nuôi cấy MS bổ sung 0,2 mg/l Kinetin; 0,2 mg/l NAA; 0,2 - 0,8 mg/l BAP ảnh hưởng rõ rệt đến hệ số nhân chồi và chất lượng chồi. Môi trường nuôi

cây bổ sung 0,2 mg/l BAP cho hệ số nhân chồi thấp nhất chỉ đạt 3,24 lần, chồi nhỏ, hơi vàng. Tăng nồng độ BAP đến 0,4 mg/l đã làm tăng hệ số nhân chồi (6,33 lần) và chồi mập, xanh tốt (hình 1.c). Tiếp tục tăng nồng độ BAP cao hơn 0,4 mg/l thì hệ số nhân chồi giảm, chồi sinh trưởng kém và chuyển màu vàng. Ở môi trường nuôi cấy MS bổ sung 0,3 mg/l Kinetin; 0,2 mg/l NAA; 0,2 mg/l BAP cho hệ số nhân

chồi cao nhất (đạt 5,25 lần) chồi mập và xanh tốt. Tăng nồng độ BAP cao hơn 0,4 mg/l làm giảm hệ số nhân chồi và chồi nhỏ, chuyển vàng. Như vậy, với môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung 0,4 mg/l BAP; 0,2 mg/l NAA; 0,2 mg/l kinetin; 30 g/l đường sucrose; 6,5 g/l agar thích hợp cho nhân nhanh thể chồi lan Trầm tím. Trong nhân giống *in vitro*, nhiều loại cây trồng chỉ phù hợp với các chất thuộc nhóm cytokinin, nhưng nhiều loại cây trồng khi kết hợp các chất điều hòa sinh trưởng giữa nhóm cytokinin và auxin nâng cao hiệu quả trong nhân giống. Theo nghiên cứu của Stefanello et al. (2009) nuôi cấy đỉnh rễ và lá non, trên môi trường dinh dưỡng MS, bổ sung

3 mg/l 2,4D và 1 - 3 mg/l BA có thể tạo 2 - 3 cụm protocorm/mẫu. Đây cũng là nghiên cứu đầu tiên về ảnh hưởng của tổ hợp giữa 3 chất điều hòa sinh trưởng BAP, Kinetin và NAA trong nhân giống cây *Dendrobium nestor*.

3.3. Ảnh hưởng của chất hữu cơ bổ sung đến khả năng tăng trưởng chồi

Kích thích tăng trưởng chồi là giai đoạn có ý nghĩa hết sức quan trọng đối với việc tạo ra cây con đủ tiêu chuẩn để trồng ngoài vườn ươm. Khi chồi đạt 2 - 3 lá chuyển sang môi trường kích thích tăng trưởng chồi là công thức môi trường tốt nhất tại bảng 2. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của hàm lượng chất bổ sung đến khả năng tăng trưởng chồi

CTTN	Chất hữu cơ v bổ sung (g/l)		Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều cao TB/chồi (cm)	Chất lượng cây
	Khoai tây	Chuối xanh			
ĐC	0	0	1,78	2,23	Cây nhỏ, lá ngắn và hơi xanh
CT ₁	50	-	2,78	3,67	Cây mập, lá ngắn và xanh
CT ₂	100	-	4,12	4,23	Cây mập, lá dài và xanh
CT ₃	150	-	2,57	2,88	Cây mập, lá ngắn và vàng
CT ₄	-	70	2,64	2,55	Cây nhỏ, lá ngắn và hơi vàng
CT ₅	-	100	2,92	2,75	Cây nhỏ, lá dài và vàng xanh
CT ₆	-	150	2,57	2,68	Cây nhỏ, lá dài và xanh
CT ₇	50	50	3,22	3,15	Cây mập, lá ngắn và xanh
CT ₈	70	30	3,75	3,26	Cây mập, lá ngắn và xanh
CT ₉	30	70	2,63	3,57	Cây mập, lá ngắn và vàng
	Sig		0,0001	0,0001	

Kết quả bảng 3 cho thấy bổ sung riêng rẽ hoặc kết hợp bột khoai tây và chuối ở nồng độ khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt hệ số nhân chồi và chiều cao chồi lan Trầm tím (Sig < 0,05). Bổ sung bột khoai tây vào môi trường nuôi cấy cây sinh trưởng rất tốt (với hệ số nhân chồi đạt từ 2,57 - 4,12 lần, chiều cao từ 2,88 - 4,23 cm và cây phát triển mập, sau đó đến môi trường kết hợp giữa chuối và khoai tây (hệ số nhân chồi đạt từ 2,63 - 3,75 lần, chiều cao từ 3,15 - 3,57 cm), kém nhất là môi trường chỉ bổ sung chuối xanh (hệ số nhân chồi đạt từ 2,57 - 2,92 lần, chiều cao từ 2,55 - 2,75 cm) cây nhỏ. Nhìn chung, khi lượng khoai tây và chuối tăng đến 150 mg/l chồi đều kém phát triển về chiều cao,

hệ số nhân chồi thấp và lá bị chuyển sang màu vàng. Điều này có thể do các chất hữu cơ bổ sung ở nồng độ cao làm đặc môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến khả năng hút chất dinh dưỡng của cây và làm cho cây sinh trưởng kém. Do đó, môi trường bổ sung 100 mg/l khoai tây cho hiệu quả tốt nhất, với hệ số nhân chồi đạt 4,12 lần, chồi cao 4,23 cm, thân mập lá dài và xanh (hình 1.d). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Phùng Văn Phê và cộng sự (2010) khi bổ sung 100 g/l bột khoai tây vào môi trường nuôi cấy lan Kim Tuyên (*Anoectochilus roxburghii*), kết quả hệ số nhân nhanh chồi *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy đã tăng gấp 6,5 lần. Nghiên cứu của Vũ Quốc Luận và

cộng sự (2014) khi bổ sung 100 - 200 g/l khoai tây vào môi trường nuôi cấy lan Vân hài cho cây sinh trưởng tốt cả về số lá và chiều dài lá.

Như vậy, sau 8 tuần nuôi cấy, chồi lan Trầm tím sinh trưởng và phát triển tốt nhất trên môi trường MS bổ sung 0,4 mg/l BAP; 0,2 mg/l NAA; 0,2 mg/l kinetin; 30 g/l sucrose; 5,5 g/l agar; 100 g/l khoai tây.

3.4. Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng ra rễ

Chồi đạt tiêu chuẩn 4 - 5 lá, dài 3 - 4 cm được cấy chuyển trên môi trường ra rễ, môi trường được sử dụng là MS bổ sung chất điều hòa sinh trưởng IBA và NAA với các nồng độ khác nhau. Kết quả thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng ra rễ

CTTN	Chất ĐHST (mg/l)		Tỉ lệ ra rễ (%)	Số rễ TB/cây	Chiều dài rễ TB/cây (cm)	Đặc điểm của rễ
	IBA	NAA				
ĐC	0,0		100	2,32	2,25	Rễ ngắn, màu trắng, mập
CT ₁	0,3		100	3,52	3,33	Rễ dài, màu xanh nhạt
CT ₂	0,5	0,0	100	4,15	3,25	Rễ dài, màu xanh đậm
CT ₃	0,7		100	3,08	2,17	Rễ ngắn, màu trắng, mập
CT ₄	0,3		100	4,15	3,12	Rễ dài, màu xanh nhạt
CT ₅	0,5	0,1	100	5,45	3,85	Rễ dài, màu xanh đậm
CT ₆	0,7		100	3,37	2,15	Rễ ngắn, màu trắng, mập
	Sig			0,0001	0,0001	

Số liệu bảng 4 cho thấy khả năng ra rễ của lan Trầm tím rất tốt đạt 100%. Tuy nhiên, có sự khác nhau rõ rệt về số rễ/cây và chiều dài rễ/cây giữa các công thức thí nghiệm (Sig < 0,05). Trong nhóm công thức chỉ bổ sung riêng rẽ IBA cho thấy ở nồng độ 0,5 mg/l cho hiệu quả tốt nhất (với 4,15 rễ/cây và rễ dài 3,25 cm), khi tăng hay giảm nồng độ quanh ngưỡng 0,5 mg/l IBA đều cho kết quả kém hơn. Khi bổ sung kết hợp 0,1 mg/l NAA và 0,3 - 0,7 mg/l NAA hiệu quả ra rễ tốt hơn sử dụng riêng rẽ chỉ IBA. Trong đó, công thức bổ sung 0,5 mg/l IBA; 0,1 mg/l NAA cho kết quả tốt nhất (với 5,45 rễ/cây và rễ dài 3,85 cm) (hình 1.e).

Theo nghiên cứu của Nguyễn Quỳnh Trang và cộng sự (2013), cũng phối hợp 0,3 mg/l IBA; 0,1 mg/l NAA cho kết quả khá tốt đối với

lan Phi điệp tím với tỷ lệ chồi ra rễ đạt 98%, số rễ trung bình đạt trên 3 rễ/cây và nghiên cứu của Nguyễn Văn Việt (2017) cho lan Hoàng thảo kèn giai đoạn ra rễ cũng phối hợp 0,2 mg/l IBA; 0,3 mg/l NAA với 100% chồi ra rễ, 4,8 rễ/cây và chiều dài rễ đạt 3,6 cm. Như vậy, sau 8 tuần nuôi cấy, chồi lan Trầm tím ra rễ tốt nhất trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l IBA; 0,1 mg/l NAA; 20 g/l sucrose; 6,5 g/l agar.

3.5. Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây giai đoạn vườn ươm

Cây con hoàn chỉnh có chiều cao 4 - 5 cm, rễ mập, có 5 - 6 rễ/cây được huấn luyện dưới ánh sáng tán xạ khoảng 1 - 2 tuần trước khi ra cây. Sau đó cây con được rửa sạch và cấy vào các loại giá thể khác nhau. Kết quả thu được sau 8 tuần ra ngôi được thể hiện ở bảng 5.

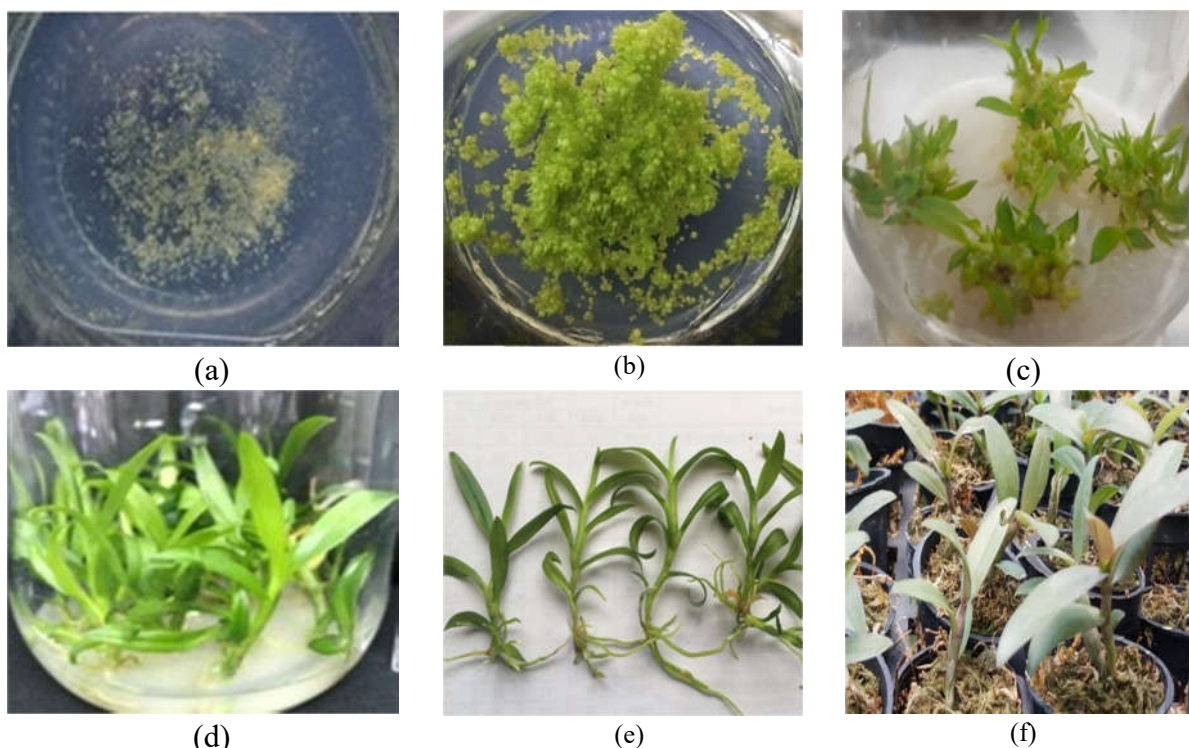
Bảng 5. Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây giai đoạn vườn ươm

CTTN	Loại giá thể	Số mẫu cây (cây)	Tỷ lệ cây sống (%)	Chất lượng cây
CT ₁	100% xơ dừa	90	76,67	Cây yếu, rễ mới bám giá thể
CT ₂	50% xơ dừa + 50% vỏ thông	90	90,00	Cây khỏe, thân cứng, rễ bám giá thể tốt
CT ₃	100% dớn trắng	90	93,33	Cây khỏe, thân cứng, xuất hiện lá mới, rễ bám giá thể tốt

Giá thể ra ngôi lan Trầm tím có ảnh hưởng rõ rệt đến tỉ lệ sống và sinh trưởng của cây con ở giai đoạn vườn ươm. Giá thể xơ dừa cho tỷ lệ cây sống thấp nhất (76,67%), cây yếu, rễ mới bám vào giá thể. Cây trồng trên giá thể trộn 50% xơ dừa; 50% vỏ thông và 100% dớn trắng cho hiệu quả tốt hơn (tỉ lệ sống 90%). Tuy nhiên, trên giá thể dớn trắng cây khỏe, thân cứng, rễ bám tốt vào giá thể và đặc biệt xuất hiện lá mới; tỷ lệ cây sống 93,33% (hình 1.f). Như vậy, với giá thể là dớn trắng đủ mềm và đủ xốp để cây có thể giữ ẩm tốt, phù hợp trong

việc ra ngôi cây mô lan Trầm tím. Kết quả này cũng tương đương với kết quả Phan Xuân Huyền và cộng sự (2015) sử dụng giá thể dớn trắng để ra cây mô loài *Miltonia sp.* với 86% cây sống, 5,60 rễ/cây và chiều dài rễ đạt 2,70 cm.

So sánh với kết quả nghiên cứu của tác giả Stefanello và cộng sự (2009), Yamamoto và cộng sự (2009) và Yamakami và cộng sự (2009) thì kết quả nghiên cứu trên hoàn toàn vượt trội. Như vậy, có thể sử dụng công thức thí nghiệm 3 (100% dớn trắng) là phù hợp cho việc trồng lan Trầm tím ngoài vườn ươm.



Hình 1. Một số hình ảnh lan Trầm tím trong quy trình nhân giống

Ghi chú: a) Hạt lan Trầm tím; b) Hạt nảy mầm; c) Nhân thể chồi; d) Tăng trưởng chồi; e) Cây hoàn chỉnh; f) Cây trồng trên giá thể dớn trắng

4. KẾT LUẬN

Khử trùng hiệu quả đối với lan Trầm tím là nhúng quả lan vào cồn 96⁰, sau đó đốt trên ngọn lửa đèn cồn, lặp lại thao tác này 3 lần cho tỉ lệ bình mẫu sạch nảy mầm đạt 90,8% sau 8 tuần nuôi cấy.

Nhân nhanh thể chồi bằng môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung 0,4 mg/l BAP; 0,2 mg/l NAA; 0,2 mg/l kinetin; 30 g/l sucrose; 5,5 g/l agar, cho hệ số nhân chồi đạt 6,33 lần sau 6 tuần nuôi cấy.

Tăng trưởng chồi trên môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung 0,4 mg/l BAP; 0,2

mg/l NAA; 0,2 mg/l Kinetin; 30 g/l sucrose; 5,5 g/l agar; 100 g/l khoai tây cho hệ số nhân chồi đạt 4,12 lần, chiều cao chồi là 4,23 cm, thân mập, lá dài và xanh sau 8 tuần nuôi cấy.

Cảm ứng ra rễ, tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung 0,5 mg/l IBA; 0,1 mg/l NAA, với 100% chồi ra rễ; 5,45 rễ/cây và rễ dài 3,85 cm sau 6 tuần nuôi cấy.

Giá thể dớn thích hợp để ra ngôi cây lan Trầm tím *in vitro* với tỉ lệ sống đạt 93,33%, cây khỏe, thân cứng, rễ bám tốt vào giá thể và xuất hiện lá mới sau 8 tuần cho ra cây ngoài vườn ươm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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

2. Nguyễn Văn Kết, Nguyễn Văn Minh (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): 89 – 95.

3. Dương Tấn Nhựt, Vũ Quốc Luận, Trịnh Thị Hương, Nguyễn Phúc Huy, Đỗ Khắc Thịnh (2014). Ảnh hưởng của các chất bổ sung hữu cơ lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan vân hải (*paphiopedilum callosum*) nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 52 (1): 49-62.

4. Phùng Văn Phê, Nguyễn Thị Hồng Gấm, Nguyễn Trung Thành (2010). Nghiên cứu kỹ thuật nhân nhanh chồi *in vitro* loài Lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii*. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 26: 248-253.

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

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

7. Nguyễn Hải Tuất, Nguyễn Trọng Bình (2005). *Khai thác và sử dụng SPSS để xử lý số liệu trong lâm nghiệp*. NXB. Nông nghiệp.

8. Jame A, Teixeira da Silva, Jean Carlos Cardoso (2015). *Dendrobium* micropropagation a review. *Plant*

cell Rep, 34: 671 – 704.

9. Lita Soetopo and Sri Lestari Purnamaningsih (2012). *In vitro* propagation of *Dendrobium* and *Phalaenopsis* through tissue culture for conservation. *Agrivita*, 34 (2): 115 – 126.

10. Sana Asghar, Touqeer Ahmad, Ishfaq Ahmad Hafiz (2011). *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var, Emma white. *African Journal of Biotechnology*, 10 (16): 3097 – 3103.

11. Stefanello S., Karsten J., Müller T.S., Tomczak A.P., Bonett L.P. and Schuelter A.R. (2009). *In vitro* conversion of *Miltonia flavescens* Lindl. Roots and leaf tip cells in protocorm like bodies and plant regeneration. *Ciência & Agrotecnologia, Lavras*, 33(1): 53 - 59.

12. Sunitibala H. and Kishor R. (2009). Micropropagation of *Dendrobium transparens* L. from axenic pseudobulb segments. *Ind. J. Biotechnol.*, 8: 448 – 4

13. Stefanello S., Silveira E.V., Oliveira L.K., Besson J.C.F. and Dutra G.M.N. (2009). Efficiency of substrates on acclimatization of *in vitro* propagated *Miltonia flavescens* Lindl. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, 2 (3): 467 - 476.

14. Yamakami J.K., Faria R.T. and Stenzel N.M.C. (2009). Vegetative development of *Brassocattleya* pastoral “Rosa” and *Miltonia regnelli* Rehb.f. X *Oncidium crispum* L. (Orchidaceae) in substrates alternative to xaxim (tree fern fiber). *Cientifica*, 37 (1): 32 - 38.

15. Yamamoto L.Y., Sorace M., Faria R.T., Takahashi L.S. and Schnitzer J.A. (2009). Alternative substrates to substitute xaxim in the cultivation of the primary hybrid *Miltonia regnelli* Rehb. f. X *Oncidium concolor* Hook. (Orchidaceae). *Ciencias Agrarias*, 30 (1): 1035 - 1042.

THE RESEARCH ON *IN VITRO* PROPAGATION OF *Dendrobium nestor*

Vu Thi Phan¹, Khuat Thi Hai Ninh², Nguyen Thi Tho³
^{1,2,3}*Vietnam National University of Forestry*

SUMMARY

Propagation of *Dendrobium nestor* by *in vitro* culture has been studied successfully. The results showed that orchid decontamination was burned 3 times 96% ethanol was rate of 90.8% after 8 weeks of culture. Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with growth regulator Benzylaminopurine (BAP) 0.4 mg/l; α -naphthalene acetic acid (NAA) 0.2 mg/l; kinetin 0.2 mg/l; sucrose 30 g/l; agar 5.5 g/l suitable for rapid multiplication shoots with shoot multiplication of 6.33 times after 6 weeks of culture. Stimulation of shoot growth by medium of protocorm growth supplemented with 100 mg/l potato gave a shoot multiplication of 4.12 times, shoot height was 4.23 cm, leafy stems were long and green. The rooting shoots rate was 100%, the average number of root was 5.45 per individual and the average length of roots was 3.85 cm when cultured in medium MS supplemented with IBA 0.5 mg/l; NAA 0.1 mg/l; sucrose 20 g/l, agar 6.5 g/l. After the plants have been trained for two week, *Dendrobium nestor* were planted on the sphagnum moss immersed got the rate of living was 93.33%, healthy plants, stems, roots of the plant and new leaves after 8 weeks. This procedure can be applied for mass production of *Dendrobium nestor* to the commercial demand.

Keywords: Benzyl aminopurine, *Dendrobium nestor*, *in vitro*, propagation, rooting.

Ngày nhận bài : 14/8/2018
Ngày phản biện : 12/11/2018
Ngày quyết định đăng : 10/12/2018