

VI NHÂN GIỐNG LAN NHẤT ĐIỂM HOÀNG (*DENDROBIUM HETEROCARPUM* LINDL.)

Đặng Thị Thắm[✉], H'Yon Niê Bing, Nguyễn Thị Thanh Hằng, Đinh Văn Khiêm, Nông Văn Duy, Trần Thái Vinh, Quách Văn Hợi, Vũ Kim Công

Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

[✉] Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: thamdag@gmail.com

Ngày nhận bài: 29.12.2016

Ngày nhận đăng: 23.10.2017

TÓM TẮT

Lan Nhất điểm hoàng (*Dendrobium heterocarpum* Lindl.) là loài hoa đẹp được sử dụng làm cảnh, đang bị đe dọa tuyệt chủng. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của BA, NAA và TDZ đến sự hình thành PLB (Protocorm-like body); BA, dịch chiết (cà rốt, khoai tây, chuối) đến sự sinh trưởng và phát triển của chồi; IAA, IBA và NAA đến sự ra rễ *in vitro*, cũng như ảnh hưởng của các loại giá thể (xơ dừa, dớn, đất sạch Eco, trấu hun phối trộn đất sạch Eco) đến sự sống sót và sinh trưởng cây con ngoài vườn ươm đã được khảo sát. Kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường thích hợp cho sự hình thành PLB là MS bổ sung 2 mg/L BA và 1,0 mg/L NAA (7,11 PLB/mẫu; 68,9% mẫu tạo PLB) hoặc môi trường MS bổ sung 1 mg/L TDZ với 0,5 mg/L NAA (7,29 PLB/mẫu; 75,53% mẫu tạo PLB). Trên môi trường nuôi cấy MS bổ sung 1,5 mg/L BA (20,47 chồi/mẫu; chiều cao chồi 1,96 cm) và môi trường nuôi cấy MS bổ sung 60 g chuối chín/lít (22,40 chồi/mẫu; chiều cao chồi 2 cm) đều phù hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của chồi cây. Môi trường thích hợp cho sự tạo rễ *in vitro* là: ½ MS bổ sung 0,5 mg/L NAA (4,4 rễ/chồi; chiều dài rễ 3,12 cm; 95,56% chồi ra rễ). Sau 60 ngày chuyển cây con *in vitro* ra ngoài vườn ươm, kết quả thí nghiệm cho thấy giá thể thích hợp nhất là giá thể dớn (5,0 rễ/mẫu; chiều dài rễ 3,4 cm; tỉ lệ sống 97,78%). Kết quả nghiên cứu nhân giống *in vitro* lan Nhất điểm hoàng góp phần bảo tồn và phát triển bền vững cũng như hướng tới việc nhân nhanh cây con phục vụ thương mại hóa loài lan rừng quý này.

Từ khóa: Bảo tồn, *Dendrobium heterocarpum* Lindl., giá thể, *in vitro*, lan rừng, PLB

MỞ ĐẦU

Chi lan Hoàng thảo (*Dendrobium*) trên thế giới có khoảng 1200 - 1400 loài, ở Việt Nam có 101 loài và 1 thứ, phân bố ở các vùng núi từ Bắc vào Nam và trên một số đảo ven biển (Dương Đức Huyền, 2007). Tuy nhiên, nhiều loài lan rừng Việt Nam đang có xu hướng giảm đi do những ảnh hưởng bất lợi của điều kiện môi trường sống và sự khai thác quá mức của con người. Trong đó, Nhất điểm hoàng cho hoa to đẹp, màu vàng rom, cánh môi màu da cam với sọc đỏ hay nâu; hoa có hương thơm, lâu tàn nên rất được khách hàng ưa chuộng và với tình trạng thu hái, buôn bán lan rừng trái phép phổ biến như hiện nay sẽ dẫn đến nguy cơ mất nguồn gen loài lan quý hiếm trong một tương lai gần. Theo Sách đỏ Việt Nam (2007), loài này được đánh giá ở mức nguy cấp (EN) nên việc bảo tồn, quản lý và khai thác nguồn tài nguyên này một cách hợp lý là cấp thiết (Nguyễn Tiến Bản, 2007).

Trong tự nhiên, lan nhân giống chủ yếu bằng hình thức sinh sản vô tính là nhân chồi, nhưng hệ số nhân giống thấp. Bên cạnh đó, hạt lan trong tự nhiên rất khó nảy mầm vì không có nội nhũ (Trần Hợp, 1998). Hiện nay, cùng với sự phát triển của công nghệ sinh học, việc nhân giống *in vitro* được xem là phương pháp hữu hiệu nhất để nhân nhanh và bảo tồn nhiều loài lan quý hiếm (Mitra, 1986). Cho đến nay đã có nhiều công trình nghiên cứu vi nhân giống chi *Dendrobium* như: *D. transparens* L. (Sunitibala, Kishor, 2009); *D. draconis* Rchb.f. (Niramol, 2009); *D. chrysanthum* Lindl. (Koravid, 2011); *D. aggregatum* (Vijayakumar *et al.*, 2012); *D. wangliangii* (Dake *et al.*, 2013); *D. chrysanthum* Wall. ex Lindl. (Rao, Barman, 2014); *D. officinale* Kimura et Migo (Nguyễn Thị Sơn *et al.*, 2014). Tuy nhiên, vẫn chưa có nghiên cứu cụ thể về việc nhân giống *in vitro* loài lan Nhất điểm hoàng. Để góp phần vào công tác bảo tồn cũng như hướng tới việc

nhân nhanh cây con phục vụ thương mại hóa loài hoa đẹp, quý hiếm và có giá trị thẩm mỹ cao của Việt Nam thì nhân giống *in vitro* lan Nhất điểm hoàng là việc làm cấp thiết và có ý nghĩa.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Mẫu cây là chồi ngủ của những cây lan rừng thuộc loài Nhất điểm hoàng đang được trồng tại Vườn Bảo tồn lan của Viện Nghiên cứu Khoa học Tây nguyên.

Phương pháp nghiên cứu

Môi trường nuôi cấy

Môi trường được sử dụng trong các thí nghiệm là môi trường khoáng MS (Murashige, Skoog, 1962) hoặc ½ MS có bổ sung thêm 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 10% nước dừa và 1 g/l than hoạt tính. Ngoài ra, tùy theo mục đích thí nghiệm mà môi trường nuôi cấy sẽ bổ sung thêm dịch chiết chuối chín, khoai tây, cà rốt, nước dừa và các chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Cách làm dịch chiết: Cà rốt để cả vỏ rửa sạch; chuối tiêu chín bỏ vỏ, xay nhỏ mịn riêng từng loại; khoai tây để cả vỏ rửa sạch luộc chín dùng cả nước luộc xay nhỏ mịn. Tất cả các môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH = 5,8 và được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm, trong 25 min. Mẫu sau khi cấy được nuôi trong điều kiện nhiệt độ 25 ± 2°C, cường độ chiếu sáng 35 μmol.m⁻².s⁻¹ thời gian chiếu sáng 8 h (Đặng Thị Thắm *et al.*, 2016).

Phương pháp khử trùng

Các chồi ngủ được rửa sạch dưới vòi nước, ngâm trong xà phòng loãng 15 min rồi rửa sạch xà phòng dưới vòi nước chảy. Sau khi rửa sạch đem mẫu vào tủ cấy ngâm trong dung dịch Streptomycine 2‰ trong vòng 20 phút lắc đều và rửa lại bằng nước cất từ 3 - 6 lần. Cuối cùng mẫu được khử trùng bằng HgCl₂ 1‰ thêm vài giọt Tween 80 trong vòng 8 min và rửa lại bằng nước cất vô trùng. Mẫu sau khi khử trùng được tiến hành cấy trên môi trường ½ MS có bổ sung 0,1 mg/L NAA; 1 mg/L BA (Đặng Thị Thắm *et al.*, 2016).

Khả năng tạo PLB

Các PLB được hình thành từ nuôi cấy chồi ngủ

sau 30 ngày cấy vào môi trường nuôi cấy MS có bổ sung BA (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mg/L) kết hợp NAA (0,2; 0,5; 1,0). Tiếp tục thực hiện thí nghiệm với môi trường nuôi cấy MS có bổ sung độc lập TDZ (0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 mg/L) và kết hợp NAA (0,5 mg/L).

Tái sinh chồi *in vitro*

Cấy vào mỗi bình thí nghiệm 3 cụm chồi có chiều cao 6 mm, mỗi cụm có chứa 03 chồi được cấy vào môi trường nuôi cấy MS có bổ sung BA (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 mg/L) hoặc các dịch chiết (khoai tây, cà rốt, chuối).

Hình thành cây *in vitro* hoàn chỉnh

Chọn những chồi có chiều cao khoảng 2 cm, tương đối đồng đều nhau được cấy trên môi trường nuôi cấy ½ MS có bổ sung riêng rẽ IAA, IBA, NAA ở các nồng độ 0; 0,3; 0,5; 1,0 mg/L.

Khảo sát ảnh hưởng của giá thể lên sự thích nghi và sinh trưởng của cây con ở giai đoạn *ex vitro*

Chọn những cây Nhất điểm hoàng đồng đều về chiều cao, số rễ, chiều dài rễ trồng trên giá thể xơ dừa, dớn, đất sạch Eco, trấu hun phối trộn đất sạch Eco. Chi tiêu theo dõi là số rễ, chiều dài rễ (cm) và tỉ lệ sống của cây (%).

Xử lý số liệu

Các thí nghiệm ở giai đoạn *in vitro* được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Mỗi thí nghiệm thức được cấy 5 bình, mỗi bình 3 mẫu cấy. Số liệu thu thập được xử lý bằng phần mềm phân tích thống kê SPSS 16.0 theo phương pháp Duncan. Ở giai đoạn *ex vitro*, mỗi giá thể được trồng 45 cây con, số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsof Excel 2010.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của BA, NAA và TDZ lên khả năng tạo PLB

Ảnh hưởng của BA kết hợp NAA đến khả năng hình thành PLB

Sau khi tiến hành vào mẫu chồi ngủ 30 ngày, những mẫu sạch nấm bệnh được chọn và chuyển vào môi trường MS có bổ sung BA và NAA với các nồng độ khác nhau để tiến hành thí nghiệm. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA kết hợp NAA đến khả năng hình thành PLB sau 45 ngày nuôi cấy.

BA	NAA	Số PLB / mẫu cấy	% mẫu cấy tạo PLB
0	0	2,02 ^h	28,83 ^g
1	0,2	3,22 ^g	42,23 ^f
1,5	0,2	3,73 ^{ef}	51,10 ^{cde}
2	0,2	4,22 ^{de}	48,90 ^{def}
2,5	0,2	3,89 ^e	55,53 ^{bcd}
1	0,5	5,00 ^c	57,77 ^{bc}
1,5	0,5	3,38 ^g	44,43 ^{ef}
2	0,5	4,45 ^d	55,53 ^{bcd}
2,5	0,5	5,60 ^b	62,23 ^{ab}
1	1	5,00 ^c	55,53 ^{bcd}
1,5	1	4,62 ^{cd}	53,3 ^{cd}
2	1	7,11^a	68,9^a
2,5	1	5,00 ^c	55,53 ^{bcd}

Chú thích*: Những chữ cái khác nhau (a,b,c,...) trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Trong thí nghiệm này, mô phân sinh chồi phát triển từ một khối tròn trong suốt sau 1 tuần nuôi cấy, phát triển mô, hình thành PLB sau 30 ngày nuôi cấy đến 45 ngày nuôi cấy tạo PLB hình cầu, màu xanh vàng. Phương pháp nuôi cấy đỉnh chồi là kỹ thuật vừa tạo ra cây sạch bệnh virus vừa cho tỷ lệ nhân giống cao bởi vì đỉnh chồi là bộ phận đặc biệt nhất của cây, không chỉ được che chắn bởi những sơ khởi lá mà tại vị trí này, hệ thống mạch chưa liên kết tới nên thường không bị xâm nhiễm bởi virus. Hơn nữa, sự di chuyển của virus không theo kịp với tốc độ phân chia tế bào ở vùng mô phân sinh ngọn (Morel, 1960). Kỹ thuật này cho phép nhân giống với một tỷ lệ nhân giống cao vì bộ phận đỉnh chồi còn ở giai đoạn non, chứa các tế bào gốc nên quá trình phân chia và phân hóa diễn ra mạnh. Như vậy, nhân giống lan từ các protocorm xuất phát từ đỉnh chồi được xem là ổn định về nguồn gen và sạch bệnh.

Kết quả trên bảng 1 cho thấy, sau 45 ngày 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 bổ sung chất kích thích sinh trưởng số PLB/mẫu cấy cao hơn môi trường không bổ sung chất kích thích sinh trưởng (Hình 1c, 1d). Như vậy, khả năng tạo PLB phụ thuộc vào nồng độ tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng có trong môi trường. Trên môi trường nuôi cấy MS bổ sung 2 mg/L BA và 1 mg/L NAA là môi trường tối ưu tạo PLB đối với loài *D. heterocarpum* Lindl., cho số PLB/mẫu cấy và phần trăm mẫu tạo PLB cao nhất (7,11 PLB/mẫu; 68,9% mẫu tạo PLB) ở độ tin cậy 95% (Hình 1d). Kết quả

của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Niramol (2009) trên loài *D. draconis* Rchb.f. Tuy nhiên, Sunitibala và Kishor (2009) khi nhân giống *D. transparens* L. đã chỉ ra rằng trên môi trường nuôi cấy ½ MS bổ sung BA (0,5; 1; 2; 4 mg/L) kết hợp NAA (1 mg/L) không tạo PLB và callus, mà môi trường tạo PLB là ½ MS bổ sung 0,5 mg/L BA.

Ảnh hưởng của TDZ kết hợp NAA đến khả năng hình thành PLB

Khả năng hình thành PLB của chồi lan *D. heterocarpum* Lindl. sau 45 ngày nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung độc lập TDZ (0,05; 0,1; 0,5; 1; 1,5 mg/L) và kết hợp NAA (0,5 mg/L) được thể hiện ở bảng 2.

Kết quả thu được ở bảng 2 cho thấy, trong môi trường bổ sung TDZ kết hợp NAA thì khả năng hình thành PLB được cảm ứng mạnh đối với mẫu cấy hơn môi trường bổ sung độc lập TDZ. Sau 45 ngày nuôi cấy, các công thức thí nghiệm đều có sự khác nhau về giá trị chỉ tiêu nghiên cứu. Trong đó, môi trường nuôi cấy MS bổ sung 1 mg/L TDZ và 0,5 mg/L NAA là môi trường thích hợp tạo PLB, cho số PLB/mẫu cấy và phần trăm mẫu tạo PLB cao nhất (7,29 PLB/mẫu; 75,53% mẫu tạo PLB) (Hình 1e). Tuy nhiên, khi nồng độ TDZ tăng lên 1,5 mg/L kết hợp 0,5 mg/L NAA thì có tác dụng ức chế sự hình thành PLB và đặc biệt mẫu có màu xanh nhạt, tạo thành khối không thích hợp cho sự phát triển của chồi cây. TDZ là chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin có tác dụng kích thích sự phân chia

tế bào và hình thành chồi trong nhân giống *in vitro*. Hiện nay, TDZ được ứng dụng rộng rãi trong nhân giống *in vitro* cây hoa lan. Trần Thị Ngọc Lan *et al.*, (2014) khi nhân giống 4 loài địa lan đã bổ sung vào môi trường nuôi cấy 0,1 mg/L TDZ làm tăng số PLB được nhân lên; tuy nhiên, các PLB được tạo thành có chồi kéo dài và mỏng nước. H'Yon Niê Bing *et al.*, (2016) trong nghiên cứu nhân giống Thanh đạm Tuyết ngọc đã bổ sung TDZ ở các nồng độ khác nhau vào môi trường để nhân nhanh PLB; kết quả thu được tái sinh chồi trực tiếp sau đó chồi phình to và mỏng nước. Paromik *et al.*, (2014) cũng đã sử dụng TDZ trong nhân giống *in vitro* loài *D. nobile* Lindl., kết quả nghiên cứu cho thấy trên môi trường

nuôi cấy bổ sung 1,5 mg/L TDZ thích hợp tạo PLB; khi nồng độ TDZ tăng lên 2 mg/L có cảm ứng tạo PLB nhưng PLB thu được hạn chế sự hình thành chồi. Như vậy, TDZ có tác động cảm ứng tái sinh mạnh đối với các loài lan; tuy nhiên, ở các đối tượng nghiên cứu khác nhau thì tùy thuộc nồng độ TDZ sử dụng mà mẫu mô có những đáp ứng thay đổi sinh hoá, sinh lý, hình thái khác nhau.

Như vậy, môi trường nuôi cấy MS bổ sung 2 mg/L BA, 1 mg/L NAA hoặc môi trường MS bổ sung 1 mg/L TDZ và 0,5 mg/L NAA được chọn làm môi trường tạo PLB nhân giống *D. heterocarpum* Lindl.

Bảng 2. Ảnh hưởng của TDZ kết hợp NAA đến sự hình thành PLB sau 45 ngày nuôi cấy.

TDZ	NAA	Số PLB / mẫu cấy	% mẫu cấy tạo PLB
0	0	2,02 ^f	28,83 ^d
0,05	0	2,22 ^f	33,30 ^{cd}
0,1	0	3,64 ^e	57,77 ^{ab}
0,5	0	4,35 ^d	62,23 ^{ab}
1	0	6,65 ^b	68,90 ^{ab}
1,5	0	7,04 ^{ab}	51,31 ^{bc}
0,05	0,5	3,73 ^e	51,10 ^{bc}
0,1	0,5	5,11 ^c	66,70 ^{ab}
0,5	0,5	6,62 ^b	71,10 ^{ab}
1	0,5	7,29^a	75,53^a
1,5	0,5	6,80 ^b	75,53 ^a

Chú thích.*: Những chữ cái khác nhau (a,b,c,...) trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Tái sinh chồi *in vitro*

Khảo sát ảnh hưởng của BA đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro*

Sau 60 ngày nuôi cấy trên môi trường ½ MS bổ sung BA (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 mg/L), khả năng hình thành và sinh trưởng chồi cây *D. heterocarpum* Lindl. được thể hiện ở bảng 3.

Kết quả trên bảng 3 cho thấy, sự hình thành và sinh trưởng chồi cây tốt nhất trên môi trường ½ MS bổ sung 1,5 mg/L BA, chiều cao chồi đạt 1,96 cm với 20,47 chồi/mẫu (Hình 1f₄). Nồng độ của BA tăng 0 - 1,5 mg/L thì sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi tăng lên (Hình 1f₁, 1f₂, 1f₃), nhưng khi nồng độ BA tăng lên 2,0 - 2,5 mg/L thì sự hình thành chồi và sinh trưởng chồi cây giảm xuống (Hình 1f₅, 1f₆). Điều này cho thấy, nồng độ BA từ 0 - 1,5 mg/L có tác dụng thúc đẩy PLB phát triển thành chồi, nhưng

khi nồng độ BA tăng lên 2,0 - 2,5 mg/L sẽ có tác dụng kìm hãm các PLB phát triển thành chồi cây. BA là chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin có vai trò quan trọng trong phân chia tế bào và kích thích sự hình thành chồi. Bởi vậy, trong nuôi cấy mô tế bào thực vật BA thường được sử dụng trong giai đoạn nhân nhanh. Vijayakumar *et al.*, (2012) trong nghiên cứu nhân giống *D. aggregatum* cũng thu được kết quả môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L BA và 150 ml/l nước dừa là tốt nhất cho nhân chồi. Nguyễn Thanh Tùng *et al.*, (2010) đã khảo sát ảnh hưởng của TDZ, Kinetin và tổ hợp Kinetin với NAA lên khả năng tái sinh chồi của *D. aduncum* từ PLB; kết quả thu được môi trường nuôi cấy MS bổ sung 3 mg/L Kinetin kết hợp 0,3 mg/L NAA cho tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất. Nồng độ của BA được sử dụng trong nhân giống *in vitro* ở những loại cây khác nhau là khác nhau, có loại cây thích hợp ở nồng độ thấp, có loại cây thích hợp ở nồng độ cao.

Bảng 3. Ảnh hưởng của BA kết hợp NAA đến khả năng hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro*.

BA (mg/L)	Chiều cao chồi (cm)	Số chồi/cụm
0	1,37 ^d	14,60 ^e
0,5	1,76 ^{bc}	16,40 ^d
1,0	1,90 ^{ab}	18,07 ^b
1,5	1,96^a	20,47^a
2,0	1,70 ^c	18,47 ^b
2,5	1,65 ^c	17,33 ^c

Chú thích: *: Những chữ cái khác nhau (a,b,c,...) trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Ảnh hưởng của dịch chiết củ, quả lên sự hình thành và sinh trưởng chồi cây

Cấy vào mỗi bình thí nghiệm 3 cụm chồi có chiều cao 6 mm, mỗi cụm có chứa 3 chồi được đưa vào nuôi cấy trên nền môi trường MS có bổ sung các dịch chiết (khoai tây, chuối, cà rốt) qua đó xác định được ảnh hưởng của các chất bổ sung này đến sự hình thành và sinh trưởng chồi cây. Kết quả được thể hiện ở bảng 4.

Kết quả thu được ở bảng 4 cho thấy, đối với môi trường bổ sung dịch chiết sự hình thành và phát triển

chồi cây tốt hơn môi trường không bổ sung dịch chiết (Hình 1g). Chen và Chen (1998) khi nghiên cứu nhân giống lan *Oncidium* thu được kết quả sự sinh trưởng của cây tốt nhất trên môi trường bổ sung các dịch chiết chuối, cà rốt, khoai tây, nước dừa và tryptophan. Các dịch chiết chuối, khoai tây, khoai sọ có chứa niacin và một số vitamin; kích thích sự nảy mầm và sinh trưởng của cây lan (Islam *et al.*, 2000). Trong nghiên cứu này, khi bổ sung riêng lẻ dịch chiết Khoai tây, Cà rốt vào môi trường nuôi cấy chồi thu được có màu vàng nhạt, thân mảnh; sự hình thành và phát triển chồi cây tốt nhất trên môi trường MS bổ sung 60 g Chuối/lít môi trường cho số chồi/cụm nhiều nhất (22,40 chồi/cụm), chiều cao chồi đạt 2 cm/chồi và chồi có màu xanh đậm (Hình 1g₃). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Thị Sơn *et al.*, (2014) bổ sung 60 g Chuối/lít môi trường khi nhân nhanh cụm chồi lan *D. officinale* Kimura et Migo. Dịch chiết chuối khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy có tác dụng kích thích sự hình thành và phát triển chồi từ PLB với lan *Dendrobium* (Aktar *et al.*, 2008). Saranjeet và Bhutani (2012) cho rằng dịch chiết chuối làm tăng số lượng lá *D. nobile*. Như vậy, môi trường MS bổ sung 60 g Chuối/lít môi trường là tối ưu cho nhân nhanh cụm chồi loài *D. heterocarpum* Lindl.

Bảng 4. Ảnh hưởng của dịch chiết củ, quả đến sự hình thành và sinh trưởng chồi cây sau 60 ngày nuôi cấy.

	Chiều cao chồi (cm)	Số chồi/cụm
Đối chứng (ĐC)	1,30 ^d	14,40 ^d
ĐC + 60g khoai tây/L môi trường	1,67 ^b	18,60 ^b
ĐC + 60g chuối/L môi trường	2,00^a	22,40^a
ĐC + 60g cà rốt/L môi trường	1,50 ^c	15,13 ^c

Chú thích: *: Những chữ cái khác nhau (a,b,c,...) trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Bảng 5. Ảnh hưởng của IAA, IBA, NAA lên sự ra rễ của loài *D. heterocarpum* Lindl.

IAA	IBA	NAA	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ / chồi	Chiều dài rễ (cm)
0	0	0	48,89	1,27 ^{e*}	1,28 ^f
0,3	0	0	55,56	1,4 ^e	1,50 ^{ef}
0,5	0	0	60	1,8 ^{de}	1,66 ^{ef}
1,0	0	0	57,78	1,6 ^e	1,82 ^{de}
0	0,3	0	60	2,2 ^{cd}	1,90 ^{de}
0	0,5	0	71,11	2,8 ^c	2,12 ^{cd}
0	1,0	0	68,89	2,6 ^c	1,73 ^{de}
0	0	0,3	80	3,8 ^{ab}	2,68 ^b
0	0	0,5	95,56	4,4^a	3,12^a
0	0	1,0	82,22	3,6 ^b	2,43 ^{bc}

Chú thích: *: Những chữ cái khác nhau (a,b,c,...) trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Khảo sát ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng (IAA, IBA, NAA) đến khả năng tái sinh rễ *in vitro*

Các chồi cây *D. heterocarpum* Lindl. đồng đều về chiều cao được cấy trên môi trường ½ MS bổ sung độc lập các chất kích thích sinh trưởng IAA, IBA, NAA ở nồng độ 0,5; 1,0 và 1,5 mg/L, khả năng tái sinh rễ *in vitro* của các chồi lan *D. heterocarpum* Lindl. sau 60 ngày nuôi cấy thể hiện trên bảng 5.

IAA, IBA, NAA đều là các auxin có tác dụng kích thích sự hình thành và kéo dài rễ. Do các chất này gây ra sự giảm độ pH trong thành tế bào nên hoạt hóa các enzym phân hủy các polysaccharide là pectin methylesterase liên kết giữa các sợi cellulose làm chúng lỏng lẻo. Vách tế bào mềm và trở nên lỏng lẻo hơn làm tế bào kéo dài ra. Tùy theo loại auxin mà tác dụng kéo dài cũng khác nhau. Kết quả trên Bảng 5 cho thấy, trong môi trường không bổ sung chất kích thích sinh trưởng cũng có sự xuất hiện rễ. Tuy nhiên, khi bổ sung chất kích thích sinh trưởng vào môi trường nuôi cấy sẽ rút ngắn được thời gian tạo rễ và tỷ lệ ra rễ cao hơn. Ở các nghiệm thức bổ sung IBA (0,3; 0,5; 1,0 mg/L) cho tỷ lệ ra rễ lần lượt là 60; 71,11; 68,89%; trong đó bổ sung 0,5 mg/L IBA cho số rễ cao nhất đạt 2,8 rễ/chồi, chiều dài rễ là 2,12 cm với 71,11% chồi ra rễ tuy nhiên rễ mảnh, yếu (Hình 1h₅, 1h₆, 1h₇). Các nghiệm thức bổ sung IAA cho tỷ lệ ra rễ, số rễ và chiều dài rễ thấp hơn so với IBA và NAA khi cùng nồng độ (Hình 1h₂, 1h₃, 1h₄). NAA là chất kích thích sinh trưởng phù hợp cho sự ra rễ, khi bổ sung NAA (0,3; 0,5; 1 mg/L) vào môi trường nuôi cấy có tỷ lệ ra rễ cao trên 80%, rễ phát triển mạnh; đặc biệt nghiệm thức bổ sung 0,5 mg/L NAA có tỷ lệ ra rễ 95,56%, số lượng rễ đạt 4,40 rễ/chồi, chiều dài rễ là 3,12 cm, rễ khỏe và rễ phát triển đồng đều hơn so với các nghiệm thức bổ sung 0,3 mg/L, 0,5 mg/L NAA (Hình 1h₈, 1h₉; 1h₁₀). Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Koravisd (2011), môi trường bổ sung NAA thuận lợi nhất cho sự ra rễ của chồi lan *D.*

chrysanthum Lindl. với 4,8 rễ/chồi. Dake *et al.*, (2013) sử dụng môi trường ½ MS bổ sung 0,5 mg/L NAA tạo rễ *in vitro* cây *D. wangliangii*. Như vậy, môi trường ½ MS có bổ sung 0,5 mg/L NAA thích hợp cho quá trình tái sinh rễ *in vitro* cây *D. heterocarpum* Lindl.

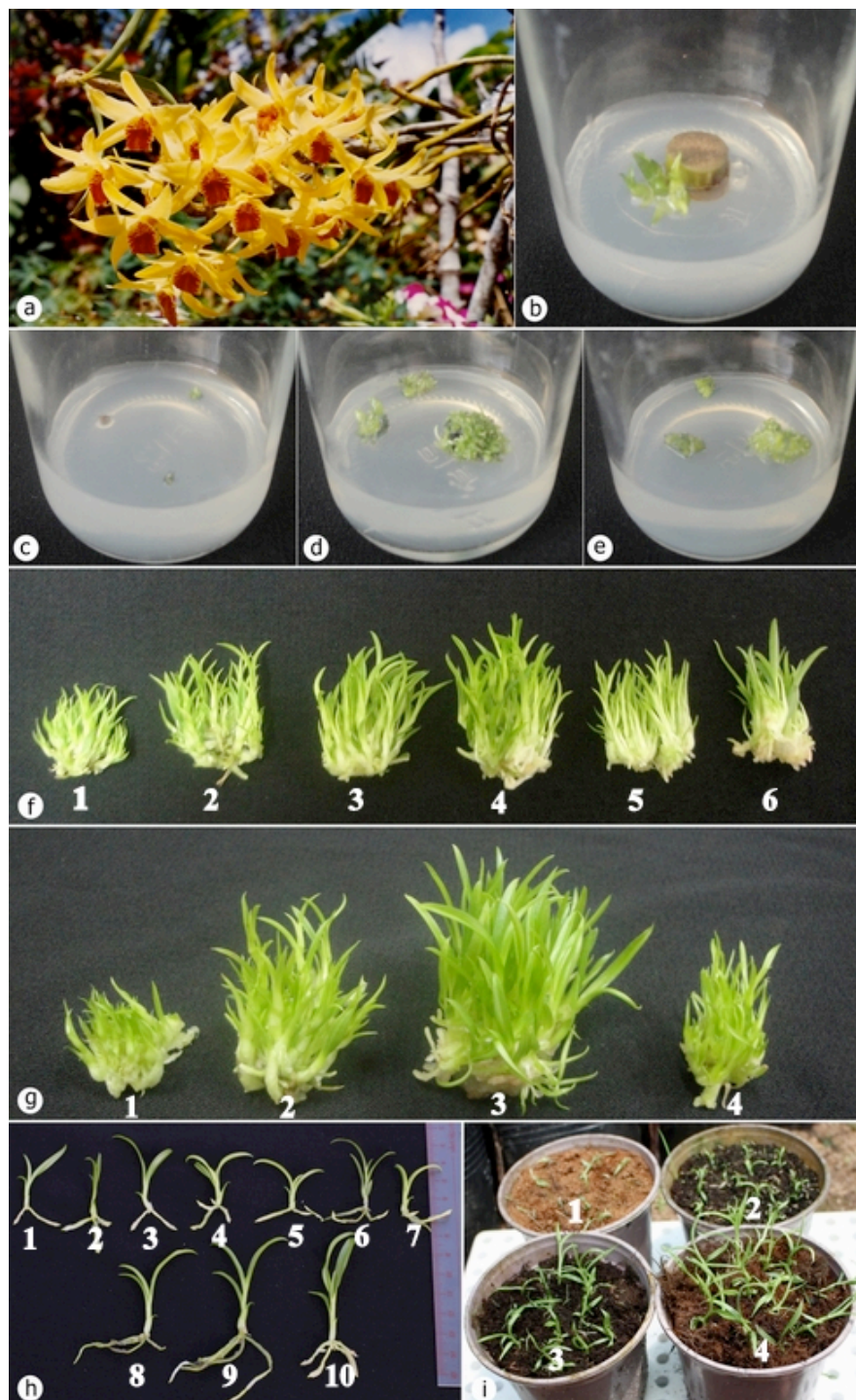
Khảo sát ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống và chất lượng cây con *D. heterocarpum* Lindl.

Khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây cấy mô *D. heterocarpum* Lindl. ở giai đoạn vườn ươm sau 60 ngày trồng và chăm sóc trên giá thể bột xơ dừa, đất sạch Eco, trấu hun phối trộn đất sạch Eco và đốn được thể hiện trên bảng 4.

Qua kết quả trên bảng 6 cho thấy, các loại giá thể khác nhau cũng có ảnh hưởng khác nhau đến tỷ lệ sống của cây con. Trên giá thể bột xơ dừa, cây con có tỷ lệ sống thấp nhất (73,33%) lá xanh nhạt, chưa ra rễ mới (Hình 1i₁). Giá thể trấu hun phối trộn đất sạch Eco, cây con có tỷ lệ sống cao hơn (77,78%) tuy nhiên nhận thấy cây con yếu, chưa có rễ mới (Hình 1i₂). Giá thể là đất sạch Eco cây con cho tỷ lệ sống (80,00%) ở công thức này đã hình thành rễ mới nhưng cây con sinh trưởng chậm (Hình 1i₃). Trên giá thể đốn cây con có tỷ lệ sống cao nhất (97,78%) số rễ nhiều nhất (5 rễ/cây) và chiều dài rễ dài nhất (4,5 cm) với chất lượng cây con tốt nhất lá xanh đậm, hình thành nhiều rễ mới (Hình 1i₄). Giai đoạn chuyển cây con ra vườn ươm rất quan trọng quyết định sự thành công trong vi nhân giống. Cây *in vitro* nuôi cấy trên môi trường thạch và độ ẩm bão hòa, do vậy, khi chuyển cây con ra giai đoạn vườn ươm trồng trên giá thể mới chưa thích nghi và độ ẩm thấp nên cây con thường bị chết. Nguyễn Thị Tâm *et al.*, (2007) khi trồng cây con *in vitro* *D. hybrid* trên giá thể rêu ngoại, xơ dừa cho tỉ lệ sống (57,89% - 67,67%), Nguyễn Thanh Tùng *et al.*, (2010) trồng cây con *D. aduncum* trên giá thể rêu nước và dương xỉ (1:1) sau 30 ngày tỉ lệ sống đạt 90% cây sinh trưởng tốt, hình thành nhiều rễ mới.

Bảng 6. Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống cây con sau 60 trồng ngoài vườn ươm.

Giá thể	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ sống (%)
Bột xơ dừa	3,0	3,2	73,33
Trấu hun phối trộn đất sạch Eco (1:1)	3,0	3,7	77,78
Đất sạch Eco	3,5	3,4	80,00
Đốn	5,0	4,5	97,78



Hình 1. Nhân giống *in vitro* *D. heterocarpum* Lindl.: a. Cây *D. heterocarpum* Lindl.; b. Sau khi vào mẫu 30 ngày; c. Nghiệm thức đối chứng thí nghiệm tạo PLB; d. tạo PLB khi bổ sung 2mg/L BA và 1 mg/L NAA; e. tạo PLB khi bổ sung 1 mg/L TDZ và 0,5 mg/L NAA; f. Ảnh hưởng của BA và NAA đến sự hình thành và sinh trưởng chồi *in vitro*; g. Ảnh hưởng của dịch chiết cà rốt, chuối, khoai tây đến sự hình thành và sinh trưởng chồi *in vitro*; h. Ảnh hưởng của IAA, IBA và NAA đến sự hình thành rễ; i. Cây con ngoài vườn ươm sau 2 tháng trên các giá thể bột xơ dừa, trấu hun phối trộn đất sạch Eco (1:1), đất sạch Eco và dớn.

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường thích hợp cho sự hình thành PLB là MS bổ sung 2 mg/L BA và 1 mg/L NAA hoặc môi trường MS bổ sung 1 mg/L TDZ với 0,5 mg/L NAA. Môi trường nuôi cấy MS bổ sung 1,5 mg/L BA và môi trường nuôi cấy MS bổ sung 60 g chuối/L đều phù hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của chồi cây. Môi trường thích hợp cho sự tạo rễ *in vitro* là: ½ MS bổ sung 0,5 mg/L NAA (4,4 rễ/chồi; chiều dài rễ 3,12 cm; 95,56% chồi ra rễ). Giá thể thích hợp chuyển cây con *in vitro* ra ngoài vườn ươm là giá thể dớn.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Chương trình Tây Nguyên 2016-2020 mã số TN18/T08 đã hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aktar S, Nasiruddin KM, Hossain K (2008) Effects of different media and organic additives interaction on *in vitro* regeneration of *Dendrobium orchid*. *J Agric Ext Rural Dev* 6: 69-74.

Chen FC, Chen TC (1998) Effects of salt strength and organic additives on the *in vitro* growth of protocorm like bodies and plantlets of *Oncidium Gower Ramsey*. *J Chin Soc Hort Sci* 44 (4): 403-412.

Dake Z, Guangwan H, Zhiying C, Yana S, Li Z, Anjun T, Chunlin L (2013) Micropropagation and *in vitro* flowering of *Dendrobium wangliangii*: A critically endangered medicinal orchid. *J Med Plants Res* 7(28): 2098-2110.

Dương Đức Huyền (2007) *Thực vật chí Việt Nam*. NXB Khoa học và Kỹ thuật.

Đặng Thị Thắm, H'Yon Niê Bing, Trần Thái Vinh (2016) Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây lan Hoàng long (*Coelogyne Lawrenceana* Rolfe.). Kỳ yếu Hội nghị khoa học thanh niên Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam năm 2016: 149-156.

H'Yon Niê Bing, Đặng Thị Thắm, Nguyễn Thị Thanh Hằng, Đinh Văn Khiêm, Nông Văn Duy, Vũ Kim Công, Quách Văn Hợi, Trần Thái Vinh (2016) Nhân giống *in vitro* lan Thanh đạm Tuyết ngọc (*Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe.). *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam* 14(8): 1361-1367.

Islam MO, Matsui S, Ichihashi S (2000) Effect of complex organic additives on seed germination and carotenoid content in *Cattleya* seedlings. *Lindleyana* 15(2): 81-88.

Koravisd N (2011) Effects of NAA, amino acids and sucrose on growth of *in vitro* culture of wild orchid,

Dendrobium chrysanthum Lindl. 37th Congress on Science and Technology of Thailand, 10-12 October, 2011.

Mitra GC (1986) *In vitro culture of orchid seeds: obtaining seedlings*. In Vij SP, ed. *Biology, Conservation, and Culture of Orchids*. Affiliated East - West Press, New Delhi: 401-412.

Morel GM (1960) Producing virus - free *Cymbidiums*. *Amer Orchid Soc Bull* 29: 495-497.

Murashige T, Skoog F (1962) Arevised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Plant Physiol* 15: 473-497.

Niramol (2009) Micropropagation of *Dendrobium draconis* Rchb.f. from thin cross - section culture. *Sci Hortic* 122: 662-665.

Nguyễn Tiến Bản (2007) *Sách đỏ Việt Nam - phần II: Thực vật*. Nhà xuất bản Khoa học và Công nghệ.

Nguyễn Thanh Tùng, Lê Văn Điệp, Nguyễn Minh Trung, Trương Thị Bích Phương (2010) Áp dụng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào trong nhân giống *in vitro* cây lan Hoàng thảo thân gãy (*Dendrobium aduncum*). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 8(3): 361-367.

Nguyễn Thị Sơn, Từ Bích Thủy, Đặng Thị Nhân, Nguyễn Thị Lý Anh, Hoàng Thị Nga, Nguyễn Quang Thạch (2014). Nhân giống *in vitro* lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 12(8): 1274-1282.

Nguyễn Thị Tâm, Vũ Thị Lan, Nguyễn Thành Luân (2007) Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường và giá thể đến sinh trưởng của cây lan *Dendrobium hybrid in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 3(43): 106-110.

Paromik B, Suman K, Reemavareen D, Pramod T (2014) Genetic stability and phytochemical analysis of the *in vitro* regenerated plants of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid. *Meta Gene* 2: 489-504.

Rao S, Barman B (2014) *In vitro* micropropagation of *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl. A threatened orchid. *SAJB* 2(1): 39-42.

Saranjeet K, Bhutani KK (2012) Organic growth supplement stimulants for *in vitro* multiplication of *Cymbidium pendulum* (Roxb.) Sw. *Hort Sci (Prague)* 39(1): 47-52.

Sunitibala H, Kishor R (2009) Micropropagation of *Dendrobium transparens* L. from pseudobulb segments. *IJBT* 8: 448-452.

Trần Hợp (1988) *Phong lan Việt Nam*. NXB Nông Nghiệp Hà Nội.

Trần Thị Ngọc Lan, Nguyễn Hồng Hoàng, Nguyễn Du Sanh, Dương Tấn Nhứt (2014) Nhân giống vô tính bốn giống địa lan có giá trị kinh tế cao. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 12(7): 1125-1133.

Tạp chí Công nghệ Sinh học **16**(1): 127-135, 2018

Vijayakumar S, Rajalkshmi G, Kalimuthu K (2012) culture of immature seeds from green capsules. Propagation of *Dendrobium aggregatum* through the *Lankesteriana* 12(2): 131-135.

MICROPROPAGATION OF *DENDROBIUM HETEROCARPUM* LINDL.

Dang Thi Tham, H'Yon Nie Bing, Nguyen Thi Thanh Hang, Dinh Van Khiem, Nong Van Duy, Tran Thai Vinh, Quach Van Hoi, Vu Kim Cong

Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Dendrobium heterocarpum Lindl. is an endangered species which is currently used as ornamental pot plant for its beautiful flowers. An increase in collection for trade or any other purposes may lead to a dramatic decrease in the population of this species, thus becoming rare or endangered species in the near future. In this study, effects of plant growth regulators (BA, NAA, IAA, IBA, TDZ) and natural supplements (carrot, potato, and banana extracts) on protocorm like bodies (PLBs) formation; growth and development of shoot; and root regeneration of *D. heterocarpum* Lindl. as well as type of substrates on acclimatization and growth of seedlings were investigated. The results showed that PLBs formation was optimal on MS medium supplemented with 2.0 mg/L BA and 1.0 mg/L NAA (7.11 PLBs/explant; PLBs formation percentage of 68.9%) or MS medium supplemented with 1 mg/L TDZ and 0.5 mg/L NAA (7.29 PLBs/explant; PLBs formation percentage of 75.53%). For subculture, MS medium supplemented 1.5 mg/L BA and 60 g/L banana extract (22.40 shoots/explant; shoot length of 2 cm) was the most suitable for shoot regeneration and growth. Additionally, root formation was the most suitable on ½ MS medium supplemented with 1 mg/L NAA (4.4 roots/shoot; root length of 3.12 cm; root formation of 95.56%). Finally, the sufficiently rooted plantlets were transferred to greenhouse for hardening. After 60 days, coconut fiber substrate was the most suitable for seedling growth and development (with survival rate of 97.78%, root number of 5 and shoot length of 3.4 cm). The results of propagation *in vitro* *Dendrobium heterocarpum* Lindl. contribute to conservation and sustainable development as well as towards the rapid multiplication of seedlings for commercial commercialization of this wild orchid species.

Keywords: *conservation, Dendrobium heterocarpum* Lindl., *in vitro*, substrate, PLBs, wild orchid