

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ LÊN QUÁ TRÌNH SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN LAN THẠCH HỘC TÍA (*DENDROBIUM OFFICINALE* KIMURA ET MIGO) TRONG NUÔI CÂY *IN VITRO* VÀ *EX VITRO*

Vũ Quốc Luận¹, Hoàng Thanh Tùng¹, Vũ Thị Hiền¹, Hoàng Đắc Khải¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Trịnh Thị Hương², Bùi Văn Thế Vinh³, Vũ Thị Tư⁴, Dương Tấn Nhựt^{1,✉}

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học công nghiệp thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh

³Trường Đại học Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh (HUTECH)

⁴Trường Đại học Yersin Đà Lạt

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: duongtannhut@gmail.com

Received: 24.10.2020

Accepted: 28.12.2020

TÓM TẮT

Lan Thạch Hộc Tía (*Dendrobium officinate* Kimura et Migo) là một loài phong lan cho hoa đẹp và có nhiều dược chất quan trọng (chrysotoxene, erianin, confusarin, polysaccharide, alkaloid...) trong việc chống ung thư, chống lão hóa, tăng cường miễn dịch và giãn mạch máu; do đó, chúng được sử dụng làm thuốc trong y học cổ truyền ở nhiều nước châu Á. Trong những năm gần đây, diện tích trồng nhân tạo lan Thạch Hộc Tía tại Trung Quốc hơn 4000 hecta và giá bán trên thị trường 1 kg thân khô khoảng 80.000 NDT (khoảng 261.525.676 VNĐ). Hiện nay, chất lượng cây giống đóng vai trò quan trọng cho sự sinh trưởng và phát triển tiếp theo ở giai đoạn vườn ươm. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá tác động của một số yếu tố lên chất lượng cây giống trong nuôi cấy *in vitro* cũng như sinh trưởng và phát triển tiếp theo ở giai đoạn vườn ươm. Kết quả cho thấy, môi trường SH thích hợp cho quá trình sinh trưởng chồi *in vitro* về các chỉ tiêu theo dõi sau 90 ngày nuôi cấy. Trong quá trình nhân nhanh chồi, kết quả tốt nhất thu được 4,53 chồi/mẫu trên môi trường SH có bổ sung 2 mg/L BA, 30 g/L sucrose, 9 g/L agar, 1 g/L than hoạt tính. Môi trường SH có bổ sung 1,0 mg/L NAA, 30 g/L sucrose, 9 g/L agar và 1,0 g/L than hoạt tính kết hợp với điều kiện nuôi cấy thoáng khí thích hợp để tạo cây hoàn chỉnh với chiều cao cây 5,73 cm, số rễ (4,77 rễ/cây), chiều dài rễ (5,00 rễ/cây), khối lượng tươi (3,36 g/cây), khối lượng khô (0,31 g/cây), tổng chlorophyll (SPAD) (45,76 nmol/cm²). Cây con thu được trong điều kiện thoáng khí cho tỷ lệ sống sót 100% và khả năng sinh trưởng tốt nhất ngoài vườn ươm trên giá thể 50% vỏ thông kết hợp với 50% dớn mùt sau 12 tháng trong nhà kính.

Từ khóa: chất lượng cây giống, giá thể, lan Thạch Hộc Tía, môi trường SH, nuôi cấy thoáng khí.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan Thạch Hộc Tía (*Dendrobium officinate* Kimura et Migo) không chỉ là một loài phong lan cho hoa đẹp mà còn là một loại thảo dược với nhiều hoạt chất quan trọng (chrysotoxene, erianin, confusarin, polysaccharide, alkaloid) có vai trò quan trọng trong việc chống ung thư,

chống lão hóa, tăng cường miễn dịch và giãn mạch máu. Do đó, giá bán trên thị trường 1 kg thân khô của lan Thạch Hộc Tía khoảng 80.000 NDT (khoảng 261.525.676 đồng (Zhu et al., 2010; Yao et al., 2012; Chu et al., 2014)). Trước những năm 1990, lan Thạch Hộc Tía chủ yếu được thu hái trong tự nhiên để phục vụ cho ngành y học cổ truyền của Trung Quốc (Marilyn, 2015).

Hiện nay, môi trường sống tự nhiên của lan Thạch Hộc Tía phần lớn đã bị phá hủy do biến đổi khí hậu và quần thể của chúng đang bị suy giảm do khai thác quá mức của con người và tỷ lệ tái sinh tự nhiên thấp (Qian *et al.*, 2014). Dựa vào điều tra thực địa, ước tính số lượng quần thể hoang dã đã giảm xuống còn dưới 50% trong gần 10 năm (Dake *et al.*, 2013). Trong những năm gần đây, diện tích trồng lan Thạch Hộc Tía trong điều kiện nhân tạo tại Trung Quốc hơn 4000 ha và hướng dẫn trồng theo “thực hành nông nghiệp tốt” (Marilyn, 2015). Các nghiên cứu khảo sát về ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng, các hợp chất bổ sung (nước dừa, khoai tây, chuối, táo) và một số loại môi trường nuôi cấy như: MS, ½MS, VW, RE, B5, Hyponex đã được khảo sát bởi một số nghiên cứu trong và ngoài nước để đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển *in vitro* trên đối tượng này (Nguyễn Thị Sơn *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014). Tuy nhiên, khả năng sống sót cũng như quá trình sinh trưởng ở giai đoạn vườn ươm phụ thuộc rất lớn vào việc chuẩn hóa chất lượng cây giống trong nuôi cấy *in vitro*. Chính vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm chuẩn hóa một số yếu tố cần thiết để nâng cao tỷ lệ sống sót cũng như sinh trưởng và phát triển tiếp trong điều kiện nuôi trồng nhân tạo.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguồn mẫu

Chồi non *in vitro* có chiều cao 2,0 – 3,0 cm của cây lan Thạch Hộc Tía hiện có tại phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng (Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên) được sử dụng làm nguồn vật liệu cho tất cả các thí nghiệm.

Nắp đậy thoáng khí

Túi nylon chịu nhiệt được đục lỗ tròn với đường kính lỗ 1,0 cm, sau đó được gắn màng Millipore (Millipore Ltd., Nhật Bản) đường kính 2,5 cm, kích thước lỗ của màng 0,5 μm được sử dụng làm nắp đậy trong nuôi cấy thoáng khí.

Giá thể

Dớn mát có dạng hình sợi của thân và rễ cây

đương xi (*Cybolium barometz*). Vỏ thân khô của cây thông nhựa 2 lá (*Pinus latteri*) được cắt vụn có kích thước 0,5 - 1 cm. Sau đó, dớn mát và vỏ thông khô được ngâm trong nước sôi trong 5 - 7 ngày để loại bỏ chất chát, nhựa và các loại nấm khuẩn gây bệnh cho cây lan được sử dụng làm giá thể cho nghiên cứu này.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường sử dụng trong nghiên cứu này là ¼ MS, ½ MS, MS (Murashige, Skoog, 1962) và ¼ SH, ½ SH, SH (Schenk, Hildebrandt, 1972) có thành phần khoáng đa lượng thay đổi nhằm tìm ra môi trường thích hợp cho quá trình sinh trưởng chồi lan Thạch Hộc Tía trong nuôi cấy *in vitro*.

Điều kiện nuôi cấy

Điều kiện in vitro: Thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện phòng nuôi có độ ẩm 50 - 60%, nhiệt độ 25 ± 2°C, sử dụng bóng đèn huỳnh quang, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày với cường độ chiếu sáng từ 2.500 - 3.000 lux.

Điều kiện ex vitro: Cây con được trồng trong vườn ươm với nhiệt độ 18 - 25°C, độ ẩm trung bình khoảng 70 - 75% với ánh sáng tự nhiên có che sáng 40% bằng lưới đen, pH của giá thể trồng cây khoảng 6,5.

Bố trí thí nghiệm

Ảnh hưởng của môi trường khoáng khác nhau lên sự sinh trưởng chồi lan Thạch Hộc Tía

Chồi non có chiều cao 2,0 cm được cấy trên môi trường khoáng khác nhau như ¼ SH, ½ SH, SH, ¼ MS, ½ MS, MS có bổ sung 0,5 mg/L BA, 0,5 mg/L NAA, 30 g/L đường, 9,0 g/L agar và 1,0 g/L than hoạt tính, pH=5,8. Sau 90 ngày nuôi cấy, các chỉ tiêu theo dõi được ghi nhận: số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), khối lượng tươi (g), khối lượng khô (g), chỉ số SPAD (nmol/cm², được đo bằng máy SPAD 502).

Ảnh hưởng của BA, Kin và TDZ lên quá trình nhân nhanh chồi lan Thạch Hộc Tía

Chồi non có chiều cao 2,0 cm được cấy trên môi trường SH có bổ sung BA, Kin và TDZ ở các nồng độ khác nhau (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 mg/L), 30 g/L đường, 9 g/L agar và 1 g/L than

hoạt tính, pH = 5,8 trước khi được hấp khử trùng ở 121°C trong 30 phút. Sau 90 ngày nuôi cấy, các chỉ tiêu theo dõi được ghi nhận: số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), khối lượng tươi (g), khối lượng khô (g), chỉ số SPAD (nmol/cm²).

Ảnh hưởng của NAA, IBA và kết hợp với điều kiện nuôi cấy thoáng khí lên quá trình tạo cây lan Thạch Hộc Tía hoàn chỉnh

Chồi non có chiều cao 3,0 cm được cấy trên môi trường SH có bổ sung NAA (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 mg/L) hoặc IBA (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 mg/L), 30 g/L sucrose, 9 g/L agar và 1 g/L than hoạt tính, pH = 5,8. Sau đó, 5 bình của mỗi nồng độ IBA và NAA được thay nắp đậy có gắn màng thoáng khí. Sau 90 ngày nuôi cấy, tiến hành ghi nhận các chỉ tiêu: chiều cao cây (cm), số rễ/cây, khối lượng tươi (g), khối lượng khô (g), chỉ số SPAD (nmol/cm²).

Ảnh hưởng của cây giống và giá thể lên khả năng sinh trưởng ở giai đoạn vườn ươm

Cây con có chiều cao trung bình 5 - 6 cm của 2 điều kiện nuôi cấy thoáng khí và không thoáng khí được trồng trên 3 loại giá thể 1, 2 và 3 (1: 100% vỏ thông, 2: 100% dớn mùt, 3: 50% dớn mùt + 50% vỏ thông. Sau 12 tháng thu nhận các chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ sống sót (%), số chồi mới hình thành, khối lượng tươi, hình thái chồi.

Xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại, mỗi nghiệm thức xử lý 5 bình với 5 chồi/bình. Thí nghiệm ngoài vườn ươm được thực hiện trên mỗi loại giá thể 10 chậu với 5 cây/chậu. Số liệu được xử lý bằng phần mềm phân tích thống kê SAS 9.1 theo phương pháp Duncan test với $\alpha = 0,05$.

KẾT QUẢ

Ảnh hưởng của môi trường khoáng khác nhau lên sự sinh trưởng chồi lan Thạch Hộc Tía

Việc xác định được môi trường nuôi cấy thích hợp cho quá trình sinh trưởng và phát triển chồi lan Thạch Hộc Tía là một vật đề cần được khảo sát trong suốt quá trình nuôi cấy *in vitro*.

Trên các môi trường có chứa các thành phần muối khoáng đa lượng khác nhau đã ảnh hưởng lên quá trình sinh chồi lan Thạch Hộc Tía rõ rệt (Bảng 1). Kết quả thu nhận sau 90 ngày nuôi cấy, môi trường có thành phần khoáng đa lượng thấp như ¼ MS và ¼ SH không thích hợp cho quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Thạch Hộc Tía với hình thái chồi phát triển còi cọc, thân gầy và thấp, lá ngắn (Bảng 1, Hình 1a). Việc sử dụng môi trường có hàm lượng khoáng thấp (VW, KC, ¼ MS, ½ MS) chỉ thích hợp với giai đoạn gieo hạt cũng như nhân nhanh PLB (Protocorm like body) (Shadang *et al.*, 2007; Nguyễn Thị Sơn *et al.*, 2014; Advina *et al.*, 2014). Trong khi đó, các chỉ tiêu theo dõi trên môi trường ½ MS không có sự khác biệt nhiều so với môi trường ¼ MS và ¼ SH, tuy nhiên, trên môi trường ½ SH cho thấy sự khác biệt về hình thái chồi tương đối rõ rệt như thân mập, lá dài (Bảng 1, Hình 1a). Kết quả thu được trên môi trường MS và SH cho thấy các chỉ tiêu theo dõi đều vượt trội so với 4 môi trường đã được khảo sát (¼ MS, ¼ SH, ½ MS, ½SH) (Bảng 1).

Số chồi hình thành, chiều cao chồi cũng như tổng chlorophyll không có sự khác biệt đáng kể trên 2 môi trường MS và SH, tuy nhiên, 2 chỉ tiêu về khối lượng tươi và khô đã có sự khác biệt và đạt cao nhất trên môi trường SH (Bảng 1, Hình 1a), điều này, quá trình sinh trưởng và phát triển của lan Thạch Hộc Tía cần môi trường giàu khoáng và vitamin. Môi trường MS có bổ sung 10% nước dừa và 60 g/L chuối chín là thích hợp cho quá trình nhân nhanh cụm chồi lan Thạch Hộc Tía (Li *et al.*, 2012; Nguyễn Thị Sơn *et al.*, 2014) và nhân nhanh cụm chồi lan làm thuốc *Dendrobium nobile* Lindl cũng thu được trên môi trường MS (Vũ Ngọc Lan *et al.*, 2013). Kết quả nghiên cứu về nhân giống trên đối tượng lan Hải (*Paphiopedilum* sp.), lan Giả Hạc (*Dendrobium* sp.) cho thấy, môi trường SH là thích hợp cho quá trình sinh trưởng và phát triển *in vitro* (Vũ Quốc Luận *et al.*, 2012, 2013, 2014, 2015) và trên đối tượng lan Kim Tuyên (*Anoectochilus setaceus* Blume) nuôi cấy *in vitro* cũng cho kết quả tốt nhất trên môi trường SH (Đỗ Mạnh Cường *et al.*, 2015; Vũ Quốc Luận *et al.*, 2015, 2017). Thành phần khoáng và

vitamin trong môi trường SH phù hợp với quá trình nhân giống và tích lũy hoạt chất trên nhiều cây dược liệu như sâm Mỹ, sâm Hàn Quốc và sâm Ngọc Linh (Sijun, Daniel, 2006; Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2019). Từ những kết quả đã được công bố cho thấy, môi trường SH có chứa hàm lượng vitamin cao hơn so với môi trường MS như acid nicotinic cao 2,5

lần, myo-inositol cao gấp 10 lần và thiamine HCl cao gấp 50 lần, điều này chứng tỏ lan Thạch Hộc Tía là một cây dược liệu nên cần nhiều vitamin để phục vụ cho quá trình sinh trưởng cũng như tổng hợp các hợp chất thứ cấp (Vũ Quốc Luận *et al.*, 2012). Như vậy, môi trường SH là tốt nhất cho sự sinh trưởng và phát triển của chồi lan Thạch Hộc Tía nuôi cấy *in vitro*.

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường khoáng khác nhau lên quá trình sinh trưởng chồi lan Thạch Hộc Tía trong nuôi cấy *in vitro*.

Môi trường nuôi cấy	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Khối lượng tươi/cụm (g)	Khối lượng khô/cụm (g)	Tổng chlorophyll (nmol/cm ²)	Hình thái chồi
¼ SH	1,56 ^{c*}	3,50 ^d	1,93 ^e	0,14 ^d	39,39 ^{cd}	Chồi thấp, thân mập, lá ngắn
½ SH	2,53 ^b	4,00 ^b	2,46 ^c	0,20 ^{bc}	40,42 ^{bc}	Chồi cao trung bình, thân mập, lá dài
SH	3,30 ^a	4,55 ^a	3,06 ^a	0,24 ^a	41,80 ^a	Chồi cao, thân mập, lá dài
¼ MS	1,10 ^d	2,93 ^d	1,10 ^f	0,07 ^e	37,58 ^d	Chồi thấp, thân gầy, lá ngắn
½ MS	1,50 ^c	3,63 ^c	2,30 ^d	0,19 ^c	38,89 ^d	Chồi cao, thân mập, lá ngắn
MS	3,15 ^a	4,50 ^a	2,70 ^b	0,21 ^b	41,00 ^{ab}	Chồi cao, thân mập, lá dài
CV%	6,28	3,08	3,81	4,81	1,60	

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

Ảnh hưởng của cytokinin lên quá trình nhân nhanh chồi lan Thạch Hộc Tía trong nuôi cấy *in vitro*

Các chỉ tiêu về sinh trưởng và nhân nhanh chồi lan Thạch Hộc Tía được khảo sát trên 3 loại cytokinin (BA, Kin, TDZ) ở các nồng độ khác nhau (0 - 3 mg/L) thu được sau 90 ngày nuôi cấy cho thấy, số chồi mới hình thành có sự khác biệt so với đối chứng và đạt cao nhất từ (4,43 - 4,73 chồi/mẫu) ở nồng độ (2 - 3 mg/L BA, TDZ) (Bảng 2). Tuy nhiên, về mặt hình thái chồi và các chỉ tiêu theo dõi có sự khác biệt đáng kể, chồi sinh trưởng trên môi trường có bổ sung 2 mg/L BA cho thấy sự phát triển cân đối về hình thái

chồi và hình thành chồi mới cao (4,53 chồi/mẫu), khối lượng tươi và khô và hàm lượng chlorophyll cao nhất (3,72g; 0,31g, 44,20 nmol/cm², tương ứng) (Hình 1b). Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy hệ số nhân chồi thấp hơn 1,53 lần, tuy nhiên, về chiều cao chồi lại cho kết quả cao hơn 1,18 lần so với kết quả trong nghiên cứu của Chen và đồng tác giả (2014). Điều này cho thấy, có một mối quan hệ về chiều cao chồi và hệ số nhân chồi, hệ số nhân chồi nhiều thì chiều cao giảm và ngược lại. Chen và đồng tác giả (2014) cho rằng, môi trường ½ MS có bổ sung 2 mg/L BA; 0,1 mg/L NAA, 100 g/L dịch chiết khoai tây cho hệ số nhân chồi cao nhất và đồng thời là môi trường tốt cho quá trình sinh trưởng và tạo cây

hoàn chỉnh trên giống lan Thạch Hộc Tía. Trên giống lan *Dendrobium wangliangii*, môi trường có bổ sung 2 mg/L BA cho hệ số nhân chồi (5,57 chồi/mẫu), trong khi đó, trên môi trường có sự kết hợp 2 mg/L BA; 0,1 mg/L NAA; 100 ml/L dịch chiết chuối cho hệ số nhân chồi cao đạt 7,71 chồi/mẫu và sự kết hợp này cũng tạo ra những cây con cứng cáp với lá và chồi xanh khỏe mạnh hơn (Zhao *et al.*, 2013). BA là một chất điều hòa được sử dụng phổ biến trong quá trình kích thích sinh trưởng và nhân nhanh chồi trong nuôi cấy mô *in vitro*. Tuy nhiên, mỗi loài thực vật khác nhau có sự đáp ứng với BA khác nhau. Nghiên cứu của Pant và Thapa (2012) cũng cho thấy hệ số nhân chồi cao thu được trên môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/L BA cho hệ số nhân chồi cao (4,5 chồi/mẫu) trên giống lan Long Tu (*Dendrobium primulinum* Lindl) sau 5 tuần nuôi cấy và trên giống lan Hoàng Thảo Sáp (*Dendrobium crepidatum*) hệ số nhân chồi cao nhất (6,8 chồi/mẫu) ở nồng độ BA thấp 0,5 mg/L và có xu hướng giảm dần khi tăng nồng độ 3 mg/L BA chỉ còn (1,8 chồi/mẫu) (Nguyễn Văn Két, Nguyễn Văn Vinh, 2010).

Kết quả trên môi trường có bổ sung Kin cho thấy, sự sinh trưởng, phát triển của chồi lan Thạch Hộc Tía có sự khác biệt ở các nồng độ khác nhau, khi nồng độ Kin tăng dần đến hệ số nhân chồi tăng và đạt cao nhất (4,03 chồi/mẫu) thu được trên môi trường có bổ sung 3,0 mg/Kin (Hình 1c), tuy nhiên, giá trị SPAD lại cho kết quả giảm dần khi nồng độ Kin tăng (Bảng 2). Trên giống lan *Dimorphorchis lowii*, khi cấy mẫu theo chiều ngang trên môi trường có bổ sung 2,0 mg/L Kin cho hệ số nhân chồi cao (5,05 chồi/mẫu) (Juddy, Jualang, 2016). Martin và đồng tác giả (2005) kết quả cho số lượng chồi *Dendrobium* lai cao nhất (5,4 chồi/mẫu) thu được trên môi trường bổ sung 1,5 mg/L Kin. Riêng về chỉ tiêu chiều cao chồi cho thấy, khi tăng nồng độ Kin thì chiều cao chồi tăng và đạt cao nhất (5,7 cm) ở nồng độ 2 mg/L Kin (Bảng 2). Kabir và đồng tác giả (2013) cũng cho thấy Kin có tác dụng tốt lên khả năng kéo dài chồi ở giống lan Kim Điệp (*Dendrobium fimbriatum* Hook) trên môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/L Kin, 2,0 mg/L NAA với chiều cao chồi trung bình 6,34 cm. Asghar và

đồng tác giả (2011) cũng cho thấy Kin có khả năng kích thích kéo dài chồi lan *Dendrobium nobile* trên môi trường có bổ sung 1,5 mg/l Kin đạt 4,19 cm. Nghiên cứu của Ersan và đồng tác giả (2013) cho thấy, chồi lan *Orchis coriophora* sinh trưởng và phát triển mạnh nhất khi bổ sung ở nồng độ thấp 0,5 mg/L Kin và giảm dần khi tăng lên 2,0 mg/L. Theo Abassi và đồng tác giả (2013) cho rằng, sự nhân nhanh chồi phụ thuộc chủ yếu vào số lượng chồi và lá trên mỗi mẫu cấy. Trong nghiên cứu này, Kin có tác động mạnh mẽ đến sự phát triển của lá và kéo dài chồi.

Trong khi đó, TDZ là chất điều hòa sinh trưởng thực vật vừa mang hoạt tính cytokinin lẫn auxin, do đó, chúng được sử dụng nhiều trong nuôi cấy mô tế bào thực vật nói chung và nuôi cấy lan nói riêng (Mok *et al.*, 1982; Guo *et al.*, 2011). Trên môi trường có bổ sung TDZ cho thấy, hệ số nhân chồi tăng khi nồng độ TDZ tăng và đạt cao nhất (4,73 chồi/mẫu) ở nghiệm thức có bổ sung 3,0 mg/L. Tuy nhiên, các chỉ tiêu theo dõi như: chiều cao chồi, khối lượng tươi, khối lượng khô và hàm lượng chlorophyll tổng có xu hướng giảm dần khi nồng độ TDZ tăng (Bảng 2; Hình 1d). Điều này cho thấy, TDZ có tác động mạnh lên quá trình hình thành chồi bên, tuy nhiên, ở nồng độ cao lại gây nên những hiện tượng bất thường về hình thái chồi như chồi ngắn, thân mập, lá ngắn. Trong khi đó, khi nghiên cứu ảnh hưởng của TDZ trên một số giống lan *Dendrobium* lại cho thấy mỗi giống lan có một ngưỡng tối ưu khác nhau. Trong nghiên cứu của Nguyễn Thanh Tùng và đồng tác giả (2010) trên giống lan Hoàng Thảo Thân Gãy (*Dendrobium aduncum*) khi tăng nồng độ TDZ (0,5 – 1,5 mg/L) thì hệ số nhân chồi tăng theo và đạt cao nhất 4,79 chồi/mẫu và hệ số nhân chồi giảm xuống khi bổ sung ở nồng độ 2,5 mg/L TDZ chỉ còn 2,75 chồi/mẫu. Paromik và đồng tác giả (2014) cũng sử dụng TDZ trong nhân giống *in vitro* trên giống lan Hoàng Thảo (*Dendrobium nobile*), kết quả cho thấy, trên môi trường có bổ sung 1,5 mg/L TDZ thích hợp tạo PLB; khi tăng nồng độ TDZ lên 2 mg/L thì hạn chế sự hình thành chồi. Trong nghiên cứu của Sujjarittharakarn và Kanchanapoom (2011) cũng cho thấy ảnh hưởng của nồng độ TDZ cao lên

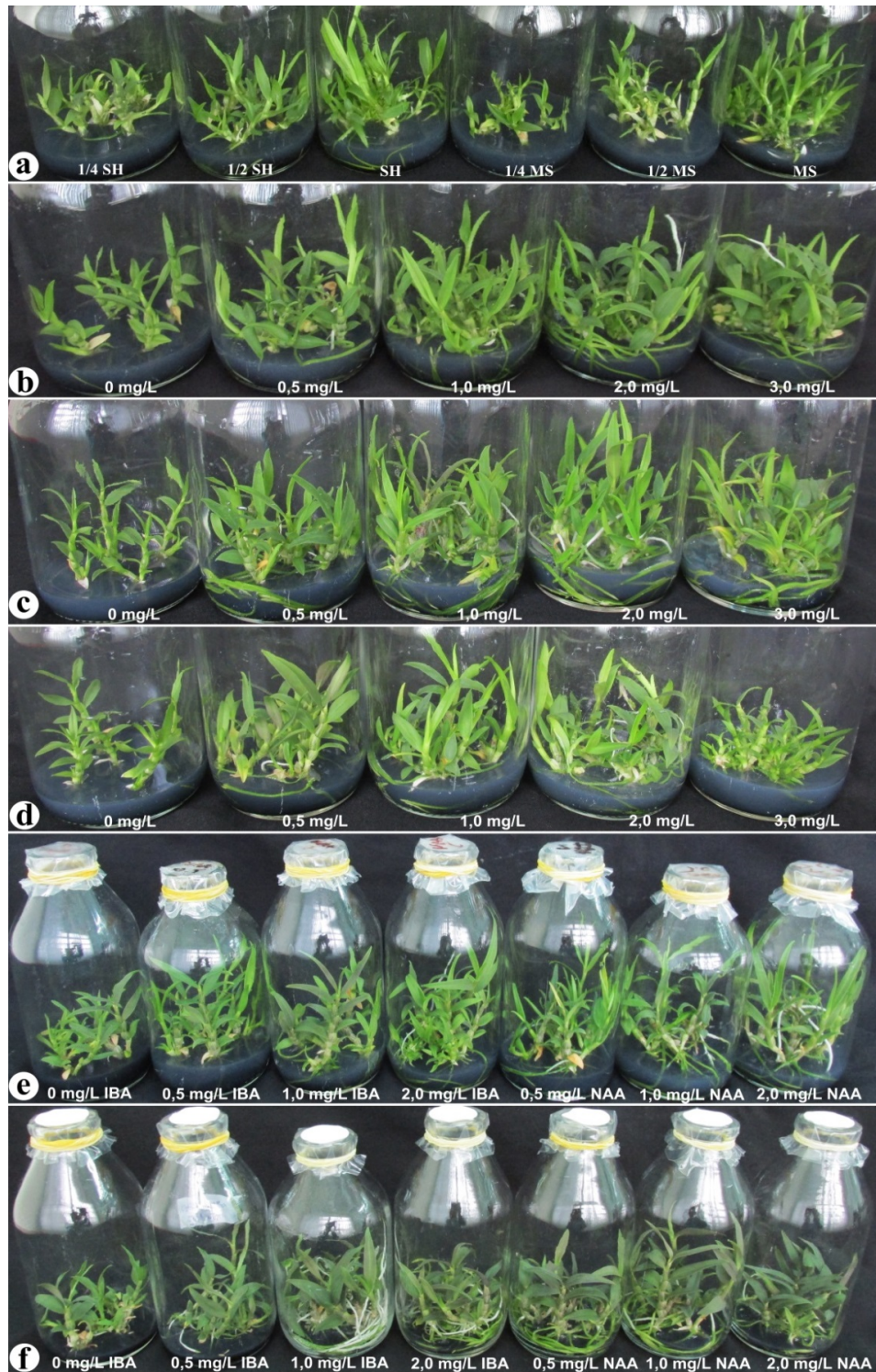
quá trình phát sinh PLBs trên giống lan *Dendrobium Dwarf*, kết quả thu được trên môi trường có bổ sung 4,0 mg/L TDZ cho tỷ lệ phát sinh PLB cao nhất 86,4% với 3,6 PLB/mẫu và giảm xuống khi bổ sung 4,95 mg/L TDZ (25,6%; 3,6 PLB/mẫu) sau 9 tuần nuôi cấy. Tuy nhiên, trên một số giống lan *Dendrobium* cho hệ số nhân giống cao khi bổ sung TDZ ở nồng độ TDZ thấp và giảm dần khi nồng độ cao và tạo ra những dạng hình thái bất thường. Trên giống lan Hoàng Thảo Sáp (*Dendrobium crepidatum*) hệ số nhân chồi cao nhất (5,2 chồi/mẫu) ở nồng độ 0,5 mg/L TDZ và có xu hướng giảm dần khi tăng nồng độ 3

mg/L TDZ chỉ còn (1,9 chồi/mẫu) (Nguyễn Văn Kêt, Nguyễn Văn Vinh, 2010). Nhìn chung, TDZ có tác dụng tích cực lên khả năng tái sinh và nhân nhanh chồi ở nồng độ thấp và thường gây ra những hiện tượng bất thường về mặt hình thái ở nồng độ cao. Các cytokinin BA, Kin, TDZ bổ sung vào môi trường nhân nhanh chồi lan đều có khả năng kích thích chồi tăng trưởng. Trong đó, chồi lan Thạch Hộc Tía *in vitro* sinh trưởng và phát triển ổn định nhất ở nghiệm thức bổ sung 2,0 mg/l BA với hệ số nhân chồi (4,53 chồi/mẫu), chiều cao chồi (3,72 cm), khối lượng tươi (0,31 g) và giá trị SPAD (44,20 nmol/cm²).

Bảng 2. Ảnh hưởng của BA, Kin và TDZ lên quá trình nhân nhanh chồi lan Thạch Hộc Tía nuôi cấy *in vitro*.

Chất điều hòa sinh trưởng mg/L			Số chồi/mẫu u	Chiều cao chồi (cm)	Khối lượng tươi/cụm (g)	Khối lượng khô/cụm (g)	Tổng chlorophyll (nmol/cm ²)	Hình thái chồi
BA	Kin	TDZ						
0,0			1,53 ^f	3,93 ^f	1,82 ^g	0,14 ⁱ	38,93 ^{fg}	Chồi cao, thân gầy, lá ngắn, xanh đậm
0,5			3,30 ^{cd}	4,53 ^{cd}	3,24 ^{bcd}	0,27 ^{bc}	41,78 ^{cd}	Chồi cao trung bình, thân mập, lá dài, xanh đậm
1,0			4,10 ^b	4,70 ^c	3,52 ^{ab}	0,30 ^{ab}	42,85 ^{bc}	Chồi cao trung bình, thân mập, lá dài, xanh đậm
2,0			4,53^{ab}	4,50^{cd}	3,72^a	0,31^a	44,20^a	Chồi cao trung bình, thân mập, lá dài, xanh đậm
3,0			4,43 ^{ab}	3,33 ^h	3,42 ^{abc}	0,24 ^{def}	43,29 ^{ab}	Chồi cao trung bình, thân mập, lá dài, xanh đậm
	0,5		2,56 ^e	4,46 ^d	3,05 ^{de}	0,22 ^{fg}	40,88 ^{de}	Chồi cao trung bình, thân mập, lá dài, xanh đậm
	1,0		3,10 ^d	5,53 ^a	3,76 ^a	0,27 ^{bc}	39,79 ^{ef}	Chồi cao trung bình, thân gầy, lá dài, xanh đậm
	2,0		3,60 ^c	5,70 ^a	3,21 ^{bcde}	0,30 ^{ab}	38,84 ^{fgh}	Chồi cao, thân gầy, lá dài, xanh đậm
	3,0		4,03 ^b	4,90 ^b	2,95 ^{de}	0,24 ^{def}	37,70 ^h	Chồi cao, thân gầy, lá dài, xanh đậm
		0,5	3,03 ^d	4,20 ^e	3,15 ^{cde}	0,25 ^{cde}	40,74 ^{de}	Chồi cao trung bình, thân mập, lá dài, xanh đậm
		1,0	4,00 ^b	3,60 ^g	2,99 ^{de}	0,22 ^{efg}	39,97 ^{ef}	Chồi lùn, thân mập, lá dài, xanh đậm
		2,0	4,60 ^{ab}	4,00 ^f	2,84 ^e	0,21 ^g	39,68 ^{ef}	Chồi lùn, thân mập, lá dài, xanh đậm
		3,0	4,73 ^a	3,25 ^h	2,30 ^f	0,18 ^h	38,05 ^{gh}	Chồi lùn, thân mập, lá ngắn, xanh đậm
CV%			3,43	2,65	6,17	6,04	1,62	

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



Hình 1. Ảnh hưởng của một số yếu tố lên quá trình sinh trưởng và phát triển lan Thạch Hộc Tía trong nuôi cấy *in vitro*. a. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy; b. Ảnh hưởng của BA; c. Ảnh hưởng của Kin; d. Ảnh hưởng của TDZ; e. Ảnh hưởng của IBA, NAA lên quá trình hình thành rễ trong điều nuôi cấy không thoáng khí; f. Ảnh hưởng của IBA, NAA lên quá trình hình thành rễ trong điều nuôi cấy thoáng khí.

Ảnh hưởng của IBA, NAA và kết hợp với điều kiện nuôi cấy không thoáng khí và thoáng khí lên quá trình hình thành rễ cây lan Thạch Hộc Tía trong nuôi cấy *in vitro*

Sự hình thành rễ trên môi trường có bổ sung IBA, NAA và kết hợp với điều kiện nuôi cấy thoáng khí sau 90 ngày nuôi cấy được thể hiện ở Bảng 3. Sự hình thành rễ trên môi trường có bổ sung IBA và NAA có sự khác biệt rõ rệt so với đối chứng, tuy nhiên, trong điều kiện nuôi cấy thoáng khí, tỷ lệ cảm ứng tạo rễ là cao nhất (4,00 – 4,77 rễ/cây) (Bảng 3; Hình 1f). Kết quả của nghiên cứu này cũng phù hợp với báo cáo của Hassankhah và đồng tác giả (2014) cho thấy chiều dài rễ, chất lượng rễ và tỷ lệ % tạo rễ cao hơn khi nuôi cấy trong điều kiện thoáng khí trên cây Óc Chó (*Juglans regia*). Các chỉ tiêu theo dõi như chiều cao cây và trọng lượng tươi cho thấy trong điều kiện nuôi cấy không thoáng khí lại cao hơn so với điều kiện nuôi cấy thoáng khí (6,36/5,73 cm; 3,42/3,36 g, tương ứng) (Bảng 3, Hình 1e). Điều này cho thấy, các cây con được nuôi trong các bình với nắp đậy kín ít bị tác động bởi yếu tố bên ngoài như nhiệt độ, độ ẩm, do đó, sự tích tụ nước trong cây nhiều dẫn đến khối lượng tươi cao. Tuy nhiên, những cây được nuôi trong bình thoáng khí cho chiều cao thấp hơn, khối lượng tươi thấp nhưng khối lượng khô và hàm lượng chlorophyll lại cao hơn đáng kể, kết quả này cho thấy, cây con sinh trưởng trong các bình có nắp đậy thoáng khí đã bị tác động nhiều bởi yếu tố bên ngoài như nhiệt độ, độ ẩm trong và ngoài bình đã được thông nhau, dẫn đến cây con có thể thu nhận một lượng lớn CO₂ từ môi trường bên ngoài phục vụ cho quá trình quang hợp dẫn đến khối lượng chất khô tăng.

Trong nghiên cứu của Vũ Quốc Luận và đồng tác giả (2017) đã cho thấy ảnh hưởng của thể tích bình nuôi cấy và kết hợp với điều kiện thoáng khí đã thúc đẩy quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Kim Tuyến *in vitro* về chiều cao chồi, số lá, chiều rộng lá, khối lượng tươi, khô và hàm lượng chlorophyll đều tăng so với đối chứng. Majada và đồng tác giả (2001) khi nuôi cấy chồi hoa Cẩm Chướng (*Dianthus caryophyllus*) trong các bình nuôi cấy thoáng khí cho thấy cho thấy chức năng của khí khổng hoàn thiện hơn so với những cây được nuôi trong bình nuôi cấy kín.

Trong nghiên cứu tái sinh rễ và tạo cây hoàn chỉnh trên một số giống phong lan cũng cho thấy 2 loại auxin được sử dụng chủ yếu là NAA, IBA và ngưỡng tối ưu cho từng giống phong lan là khác nhau. Dake và đồng tác giả (2013) cho thấy khi bổ sung 0,5 mg/L NAA cho khả năng hình thành rễ cao nhất cây giống lan *Dendrobium wangliangii*. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Thị Sơn và đồng tác giả (2014) cho thấy ở nồng độ 0,5 mg/L NAA cho khả năng tạo rễ tốt nhất trên giống lan Thạch Hộc Thiết Bì (*Dendrobium officinale* Kimura *et* Migo). Nghiên cứu của Priya và đồng tác giả (2013) cũng cho thấy chồi tạo rễ tốt trên môi trường ½MS có bổ sung 0,5 mg/L NAA trên giống lan *Denbium sonia*, khi nồng độ tăng 0,5 – 2 mg/L NAA đã gây ức chế hình thành rễ và trên môi trường có bổ sung NAA cho hiệu quả tạo rễ hơn so khi bổ sung IAA và IBA. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của Nguyễn Thanh Tùng và đồng tác giả (2010) cho kết quả tốt nhất trên môi trường có bổ sung 2,0 mg/L NAA đạt 9,18 rễ/cây với chiều dài rễ 1,37 cm.

Trong khi đó, một số tác giả lại cho thấy cảm ứng tạo rễ trên một số giống phong lan hiệu quả hơn khi sử dụng IBA. Priyanka và đồng tác giả (2018) cho kết quả tỷ lệ % cảm ứng tạo rễ trên giống lan *Dendrobium nobile* cao nhất đạt 90% trên môi trường có bổ sung 1,0 mg/L IBA. Kết quả thu được cũng tương tự khi bổ sung 1 mg/L IBA trên môi trường ½MS cho chiều cao cây tốt nhất (5,2 cm) với số rễ (9,30 rễ/cây) trên giống lan *Dendrobium fimbriatum* (Kabir *et al.*, 2013). Khi bổ sung ở nồng độ 1,5 mg/L IBA để cảm ứng tạo rễ trên giống lan Long Tu (*Dendrobium primulinum*) cho kết quả tạo rễ tốt nhất 3,0 rễ/cây với chiều dài rễ 1,3 cm (Pant, Thapa, 2012). Rao và Barman (2014) cho thấy trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L IBA cho khả năng hình thành rễ tối đa (6,84 rễ/cây) với chiều dài rễ 3,5 cm, trong khi đó, khi bổ sung 2,2 mg/L NAA thì hiệu quả hình thành rễ thấp hơn (4,80 rễ/cây) và chiều dài rễ đạt 1,46 cm trên giống lan *Dendrobium chrysanthum*. Như vậy, cảm ứng tạo rễ trên giống lan Thạch Hộc Tía trong nghiên cứu này cho kết quả tốt nhất trên môi trường có bổ sung 1,0 mg/L NAA kết hợp với nắp đậy thoáng khí là thích hợp nhất nhằm tạo điều kiện cho cây con quen dần với điều kiện sinh trưởng tiếp theo giai đoạn vườn ươm.

Bảng 3. Ảnh hưởng của IBA, NAA và kết hợp với điều kiện nuôi cấy thoáng khí lên quá trình hình thành rễ cây lan Thạch Hộc Tía nuôi cấy *in vitro*.

Điều kiện nuôi cấy	Chất điều hòa sinh trưởng (mg/L)		Chiều cao cây (cm)	Số rễ/cây	Chiều dài rễ/cây (cm)	Khối lượng tươi/cây (g)	Khối lượng khô/cây (g)	Tổng chlorophyll (nmol/cm ²)	Hình thái cây
	IBA	NAA							
Không thoáng khí	0,0		4,56 ^{i*}	2,00 ⁱ	1,55 ⁱ	2,50 ^h	0,20 ^g	39,16 ^f	Cây lùn, thân mập, lá ngắn, xanh đậm
	0,5		6,00 ^d	3,17 ^h	3,10 ^h	3,05 ^e	0,25 ^e	40,56 ^{ef}	Cây cao, thân mập, lá dài, xanh đậm
	1,0		6,36 ^a	3,35 ^g	3,87 ^{ef}	3,22 ^{cd}	0,27 ^d	39,50 ^{ef}	Chồi cao, thân mập, lá dài, xanh đậm
	2,0		6,06 ^{cd}	3,37 ^g	3,75 ^f	3,09 ^e	0,25 ^e	40,20 ^{ef}	Cây cao, thân mập, lá dài, xanh đậm
Không thoáng khí		0,5	6,13 ^{bc}	3,53 ^f	3,26 ^g	3,18 ^d	0,27 ^d	39,96 ^{ef}	Cây cao, thân mập, lá dài, xanh đậm
		1,0	6,23 ^b	3,75 ^e	4,00 ^e	3,37 ^{ab}	0,28 ^{cd}	41,16 ^{de}	Cây cao, thân mập, lá dài, xanh đậm
		2,0	6,36 ^a	3,87 ^e	4,15 ^d	3,42 ^a	0,29 ^{bc}	42,56 ^{cd}	Cây cao, thân mập, lá dài, xanh đậm
Thoáng khí	0,0		4,23 ^k	2,33 ^g	2,00 ⁱ	2,09 ⁱ	0,19 ^g	42,40 ^{cd}	Cây lùn, thân mập, lá ngắn, xanh đậm
	0,5		5,16 ^g	4,00 ^e	4,25 ^c	2,55 ^g	0,23 ^f	43,43 ^{bc}	Cây lùn, thân mập, lá ngắn, xanh đậm
	1,0		4,86 ^h	4,55 ^b	4,53 ^b	2,83 ^f	0,27 ^d	44,50 ^{ab}	Cây lùn, thân mập, lá dài, xanh đậm
	2,0		4,70 ⁱ	4,50 ^b	4,57 ^b	3,08 ^e	0,29 ^{bc}	43,33 ^{bc}	Cây lùn, thân mập, lá dài, xanh đậm
Thoáng khí		0,5	5,46 ^f	4,13 ^d	4,30 ^c	3,06 ^e	0,28 ^{cd}	42,43 ^{cd}	Cây cao, thân mập, lá dài, xanh đậm
		1,0	5,73 ^e	4,77 ^a	5,00 ^a	3,36 ^b	0,31 ^a	45,76 ^a	Cây cao, thân mập, lá dài, xanh đậm
		2,0	5,55 ^f	4,25 ^c	4,87 ^{ab}	3,25 ^c	0,30 ^{ab}	45,85 ^a	Cây cao, thân mập, lá dài, xanh đậm
CV%			1,29	7,59	5,75	1,07	3,11	2,09	

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

Ảnh hưởng của chất lượng cây giống và giá thể lên khả năng sinh trưởng ở giai đoạn vườn ươm sau 12 tháng

Ảnh hưởng của chất lượng cây giống (Hình 2a) và giá thể lên khả năng sống sót của cây con ở giai đoạn vườn ươm sau 12 tháng được thể hiện qua bảng 4. Cây con có nguồn gốc từ nuôi cấy không thoáng khí được trồng trên 100% giá thể vô thông cho tỷ lệ sống sót, số chồi mới và khối lượng tươi là thấp nhất (65; 1; 4,53; tương ứng), tuy nhiên, trong cùng điều kiện, cây con có nguồn gốc từ điều kiện thoáng khí lại cho tỷ lệ sống sót, số chồi mới và khối lượng tươi cao hơn (85; 1,2; 4,67; tương ứng) (Bảng 4). Điều này cho thấy, cây con *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường không thoáng khí có độ ẩm bão hòa dẫn đến chức năng của rễ và lá chưa kịp thích nghi với những thay đổi đột ngột ở điều kiện vườn ươm, nên khi gặp điều kiện bất lợi như nhiệt độ cao, độ ẩm không khí thấp, cộng với giá thể vô thông có khả năng giữ ẩm thấp nên tỷ lệ sống sót không cao. Đây là nguyên nhân chính dẫn đến cây con chết nhiều do mất cân bằng nước trong cây.

Trên giá thể 100% dớn mùt và 50% dớn mùt + 50% vô thông cho tỷ lệ sống sót cao, đặc biệt, cây con có nguồn gốc từ nuôi cấy thoáng khí cho tỷ lệ sống sót 100% sau 12 tháng (Bảng 4). Các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển của cây con có nguồn gốc từ nuôi cấy thoáng khí trên hỗn hợp giá thể 50% dớn mùt + 50% vô thông cho kết quả tốt nhất với tỷ lệ hình thành chồi mới (1,64 chồi/cây) và khối lượng tươi (4,96 g/cây), kết quả này cho thấy, cây con khi được nuôi cấy trong điều kiện thoáng khí đã được làm quen với điều kiện khí hậu bên ngoài, do đó, chức năng hút nước của rễ và chức năng đóng mở khí khổng đã hoàn thiện, nên khi đưa ra điều kiện nuôi trồng ngoài vườn ươm cây con tiếp tục sinh trưởng và phát triển mà không cần có một giai đoạn để thích nghi (Hình 2b).

Nuôi cấy thoáng khí đã nâng cao chất lượng cây giống thông qua sự trao đổi khí qua màng cũng đã được báo cáo bởi Vũ Quốc Luận và đồng tác giả (2017) khi nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện thoáng khí lên quá trình sinh trưởng của cây lan Kim Tuyền cho thấy, thể tích bịch nylon càng

nhỏ thì sự thoát hơi nước qua màng thoáng khí càng nhiều. Lo và đồng tác giả (2010) cũng cho thấy, sự thoát hơi nước thông qua màng thoáng khí đã làm khô môi trường nuôi cấy trong bình. Trong nghiên cứu ảnh hưởng của giá thể lên khả năng sống sót ở giai đoạn vườn ươm của một số giống lan cũng cho thấy, sự kết hợp giữa các giá thể thường tốt hơn khi sử dụng một loại giá thể. Nguyễn Thanh Tùng và đồng tác giả (2010) khi đưa cây con lan Hoàng Thảo Thân Gầy (*Dendrobium aduncum*) ra thích nghi ở điều kiện vườn ươm cho thấy, hỗn hợp giá thể rêu nước và dương xỉ với tỷ lệ 1:1 cho tỷ lệ sống sót 90%. Baker và đồng tác giả (2014) cũng cho thấy hỗn hợp giá thể gồm đá trân châu, gỗ vụn, hạt sốp và đá khoáng (1:1:1:1) cho tỷ lệ sống sót 100% khi đưa ra cây con ra thích nghi trong nhà kính. Trong nghiên cứu của Sunitibala và Rajkumar (2009) cho thấy, tỷ lệ sống sót cao 90% khi chuyển cây con ra vườn ươm trên hỗn hợp gạch và than với tỷ lệ (2:1). Vijayakumar và đồng tác giả (2012) đã cho thích nghi cây con trong điều kiện râm mát trong các chậu nhựa cho tỷ lệ sống sót 95% trên giá thể than và gạch. Rao và Barman (2014) đã thích nghi cây con trong chậu chứa hỗn hợp gạch, than và phân trùn quế cho tỷ lệ sống sót 88%. Pant và Thapa (2012) đã tiến hành thích nghi cây lan Long Tu (*Dendrobium primulinum*) ra điều kiện vườn ươm trên hỗn hợp chứa vụn sơ dừa và rêu (2:1) cho tỷ lệ sống sót gần 70%. Ngoài ra, một số tác giả cũng sử dụng các loại giá thể khác nhau để thích nghi cây con ở giai đoạn vườn ươm. Trong nghiên cứu của Chu Thị Ngọc Mỹ và đồng tác giả (2016) cho thấy, tỷ lệ sống sót 100% khi sử dụng vô thông vụn hoặc rêu trên giống lan Kiều Tím (*Dendrobium amabile*). Đặng Thị Thắm và đồng tác giả (2018) cũng cho thấy giá thể dớn cho tỷ lệ sống cao nhất (97,78%). Phạm Minh Quang và đồng tác giả (2018) cũng nghiên cứu ảnh hưởng của các giá thể lên khả năng sống sót của cây lan Năng (*Dendrobium caesar*). Kết quả cho thấy, trên giá thể vô dừa chẻ nhỏ cho tỷ lệ sống sót cao nhất 88,86%. Nguyễn Thị Tâm và đồng tác giả (2007) khi trồng cây con *in vitro* lan lai (*Dendrobium hybrid*) trên giá thể rêu ngoại và xơ dừa cho tỷ lệ sống (57,89% - 67,67%). Như vậy, kết quả của nghiên cứu này cho thấy, cây con được nuôi cấy

trong điều kiện thoáng khí cho tỷ lệ sống sót 100% và sinh trưởng tiếp theo ở giai đoạn vườn ươm trên hỗn hợp giá thể 50% dớn mùt + 50% vỏ thông là tốt nhất sau 12 tháng.

Bảng 4. Ảnh hưởng của chất lượng cây giống và giá thể lên khả năng sinh trưởng ở giai đoạn vườn ươm sau 12 tháng.

Nguồn gốc cây giống	Giá thể	Tỷ lệ sống sót (%)	Số chồi/cây	Khối lượng tươi/cây (g)	Hình thái chồi
Cây giống có nguồn gốc từ điều kiện nuôi cấy không thoáng khí	Vỏ thông	65 ^{d*}	1,00 ^f	4,53 ^e	Cây lùn, thân ốm, lá ngắn, xanh nhạt
	Dớn mùt	80 ^c	1,10 ^e	4,75 ^c	Cây lùn, thân ốm, lá ngắn, xanh nhạt
	50% vỏ thông + 50% dớn mùt	80 ^c	1,30 ^c	4,73 ^c	Cây lùn, thân ốm, lá ngắn, xanh nhạt
Cây giống có nguồn gốc từ điều kiện nuôi cấy thoáng khí	Vỏ thông	85 ^b	1,20 ^d	4,67 ^d	Cây lùn, thân ốm, lá ngắn, xanh nhạt
	Dớn mùt	100 ^a	1,50 ^b	4,83 ^b	Cây lùn, thân mập, lá ngắn, xanh đậm
	50% vỏ thông + 50% dớn mùt	100^a	1,64^a	4,96^a	Cây lùn, thân mập, lá ngắn, xanh đậm
CV%		9,50	7,15	8,98	

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



Hình 2. Ảnh hưởng của cây giống và giá thể lên khả năng sinh trưởng và phát triển ở giai đoạn vườn ươm. a. Cây con được nuôi cấy trong điều kiện không thoáng khí và thoáng khí. b. Cây con sinh trưởng trên 50% vỏ thông + 50% dớn mùt. c, d. Cây lan Thạch Hộc Tía nở hoa và đậu trái sau 12 tháng tiếp theo ở điều kiện vườn ươm.

KẾT LUẬN

Môi trường SH có bổ sung 0,5 mg/L BA, 0,5 mg/L NAA, 30 g/L đường, 9,0 g/L agar, 1,0 g/L than hoạt tính, pH = 5,8 là thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của chồi lan Thạch Hộc Tía trong nuôi cấy *in vitro*. Trong nghiên cứu nhân nhanh chồi, môi trường SH có bổ sung 2,0 mg/L BA cho hệ số nhân chồi cao (4,53 chồi/mẫu), chiều cao chồi (3,72 cm), khối lượng tươi (0,31 g) và giá trị SPAD (44,20 nmol/cm²). Tạo cây hoàn chỉnh tốt nhất thu được trên môi trường SH có bổ sung 1,0 mg/L NAA kết hợp với nắp đậy thoáng khí là thích hợp nhất cho quá trình thích nghi của cây con ở giai đoạn vườn ươm. Cây con có nguồn gốc từ nuôi cấy thoáng khí cho tỷ lệ sống sót 100% và sinh trưởng tốt nhất trên hỗn hợp giá thể 50% dớn mùt + 50% vỏ thông sau 12 tháng.

Lời cảm ơn: Tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên đã cấp kinh phí cho chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abassi NA, Pervaiz T, Hafiz IA, Yaseen M, Hussain A (2013) Assessing the response of indigenous loquat cultivar mardan to phytohormones for *in vitro* shoot proliferation and rooting. *J Zhejiang Uni-Sci B* 14(9): 774-784.
- Advina LJ, Jasim U, Sreeramanan S (2014) Efficient micropropagation of *Dendrobium sonia-28* for rapid PLBs proliferation. *Emir J Food Agric* 26(6): 545-551.
- Asghar S, Ahmad T, Hafiz IA, Yaseen M (2011) *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. *Afr J Biotechnol* 10(16): 3097-3103.
- Baker A, Kaviani B, Nematzadeh G, Negahdar N (2014) Micropropagation of orchid *catasetum* – a rare and endangered orchid. *Acta Sci Pol Hortorum Cultus* 13(2): 197-205.
- Chen B, Stephen JT, Li J, Li Q, Fan H, Zhang J (2014) Micropropagation of the endangered medicinal orchid, *Dendrobium officinale*. *Life Sci J* 11(9): 526-530.
- 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.
- Chu Thị Ngọc Mỹ, Đinh Thị Dinh, Đặng Văn Đông (2016) Ảnh hưởng của một số biện pháp kỹ thuật trong nhân giống lan Kiều Tím (*Dendrobium amabile* Lour.) bằng phương pháp tách nhánh tại Gia lâm – Hà Nội. *Tạp chí khoa học công nghệ nông nghiệp Việt Nam* 8(69): 55-59.
- 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. *J Med Plants Res* 7(28): 2098-2110.
- 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 (2018) Vi nhân giống lan nhất điểm hoàng (*Dendrobium heterocarpum* lindl.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 16(1): 127-135.
- Đỗ Mạnh Cường, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Việt Cường, Nguyễn Thanh Sang, Nguyễn Hồng Hoàng, Hồ Thanh Tâm, Nguyễn Xuân Tuấn, Trần Hiếu, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Thị Kim Loan, Dương Tấn Nhựt (2015) Ảnh hưởng của một số yếu tố lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây lan Gấm (*Anoectochilus setaceus* Blume) nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 13(3): 337-344.
- Dương Tấn Nhựt, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Trục, Nguyễn Bá Nam, Trần Xuân Tinh, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Văn Bình, Vũ Thị Hiền, Trịnh Thị Hương, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Lê Nữ Minh Thùy, Lý Thị Mỹ Nga, Thái Thương Hiền, Nguyễn Thành Hải (2010) Nhân giống vô tính cây sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 8(3B): 1211-1219.
- Guo B, Abbasi BH, Zeb A, Xu LL, Wei YH (2011) Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. *Afr J Biotechnol* 10(45): 8984-9000.
- Hassankhah A, Vahdati K, Lotfi M, Mirmasoumi M, Preece J, Assareh MH (2014) Effects of ventilation and sucrose concentrations on the growth and plantlet anatomy of micropropagated persian walnut plants. *Inter J Horti Sci Technol* 1(2): 111-120.
- Juddy EJ, Jualang AG (2016) Effect of growth regulators and explant orientation on shoot tip culture of borneo endemic orchid, *Dimorphorchis lowii*. *Trans Sci Techno* 3(2): 306-312.

- Kabir MF, Rahman MS, Jamal A, Rahman M, Khalekuzzaman M (2013) Multiple shoot regeneration in *Dendrobium fimbriatum* Hook an ornamental orchid. *J Anim Plant Sci* 23(4): 1140-1145.
- Kim JY, Adhikari PB, Ahn CH, Kim DH, Kim YC, Han JY, Kondeti S, Choi YE (2019) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of interspecific ginseng hybrid between *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*. *J Ginseng Res* 43(1): 38-48.
- Li HL, Zan YY, Yang B (2012) Tissue culture of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. *Subtrop Plant Sci* 41(3): 76-77.
- Lo KY, Ku N, Jin CS, Izzati N, Arvind B, Ning SP, Chan LK (2010) Effect of perforations of culture vessel cap on growth and leaf microstructure of *in vitro* plantlets of *Artemisia annua* L. *J Med Plants Res* 4(21): 2273-2282.
- Majada JP, Sierra MI, Sanchez TR (2001) Air exchange rate affects the *in vitro* developed leaf cuticle of carnation. *Sci Hort* 87(1): 121-130.
- Marilyn HSL (2015) Conservation of medicinal orchids. *Orchid conservation news, the newsletter of the orchid specialist group of the iucn species survival commission* 1: 1-6.
- Martin KP, Geevarghese J, Joseph D, Madassery J (2005) *In vitro* propagation of *Dendrobium* hybrids using flower stalk node explants. *Indian J Exp Biol* 43(3): 280-285.
- Mok MC, Mok DWS, Armstrong DJ, Shudo K, Isogai Y, Okamoto T (1982) Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-yl urea. *Phytochemistry* 21(7): 1509-1511.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiol Plant* 15: 473-496.
- Nguyễn Thanh Tùng, Lê Văn Điệp, Nguyễn Minh Trung, Trương Thị Bích Phượng (2010) Áp dụng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào trong nhân giống *in vitro* lan hoàng thảo thân gầy (*Dendrobium aduncum*). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 8(3): 361-367.
- 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 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.
- Nguyễn Văn Kết, Nguyễn Văn Vinh (2010) Nghiên cứu khả năng nhân giống loài lan hoàng thảo sấp (*Dendrobium crepidatum*) *in vitro*. *Tạp Chí khoa học và Công nghệ* 48(5): 89-95.
- Pant B, Thapa D (2012) *In vitro* mass propagation of an epiphytic orchid, *Dendrobium primulinum* Lindl. through shoot tip culture. *Afr J Biotechnol* 11(42): 9970-9974.
- 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.
- Phạm Minh Quang, Dương Công Kiên, Quách Ngô Diễm Phương, Hoàng Thị Thanh Minh (2018) Vi nhân giống và ra vườn ươm cây lan nấng *Dendrobium caesar*. *Tạp chí phát triển khoa học và công nghệ: chuyên san khoa học tự nhiên* 2(3): 14-22.
- Priya KI, Sabina GT, Rajmohan K (2013) Influence of plant growth regulators on *in vitro* clonal propagation of *Dendrobium sonia* 'EARS AKUL'. *Bio Innov* 2(2): 51-58.
- Priyanka S, Verma LS, Satyanarayana E, Subhankar (2018) *In vitro* regeneration and rapid multiplication of *Dendrobium nobile*. *Int J Che Stud* 6(6): 1286-1288.
- Qian X, Wang C, Tong O, Tian M (2014) *In vitro* flowering and fruiting in culture of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. (Orchidaceae). *Pak J Bot* 46(5): 1877-1882.
- Rao S, Barman B (2014) *In vitro* micropropagation of *Dendrobium chrysanthum* wall. ex lindl. –a threatened orchid. *Sch Acad J Biosci* 2(1): 39-42.
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50(1): 199-204.

- Shadang R, Padmanabh D, Hegde SN, Ahmed N (2007) Effects of different culture media on seed germination and subsequent *in vitro* development of protocorms of *Hygrochilus parishii* (Veith & Rehb.f.) Pfitz (Orchidaceae). *Indian J Exp Biol* 6: 256-261.
- Sijun Z, Daniel CWB (2006) High efficiency plant production of north American ginseng via somatic embryogenesis from cotyledon explants. *Plant Cell Rep* 25(3): 166-173.
- Sujjarittharakarn P, Kanchanapoom K (2011) Efficient direct protocorm-like bodies induction of *Dendrobium Dwarf* using Thidiazuron. *Not Sci Biol* 3(4): 88-92.
- Sunitibala H, Kshor R (2009) Micropropagation of *Dendrobium transparens* L. from axenic pseudobulb segments. *Indian J Exp Biol* 8(2): 448-452.
- Vijayakumar S, Rajalkshmi G, Kalimuthu (2012) Propagation of *Dendrobium aggregatum* by green capsule culture. *Lankesteriana* 12(2): 131-135.
- 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.
- Vũ Quốc Luận, Nguyễn Bá Nam, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Phúc Huy, Hoàng Thanh Tùng, Trần Công Luận, Dương Tấn Nhựt (2017) Ảnh hưởng của thể tích và điều kiện thoáng khí trong nuôi cấy *in vitro* và định tính hoạt chất adenosine trong cây Lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blum). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 15(2): 307-317.
- Vũ Quốc Luận, Nguyễn Phúc Huy, Đỗ Khắc Thịnh, Dương Tấn Nhựt (2014) Nhân giống vô tính lan hài hồng (*Paphiopedilum delenatii*) bằng phương pháp hủy đỉnh. *Tạp chí khoa học và công nghệ* 52(2D): 277-285.
- Vũ Quốc Luận, Nguyễn Phúc Huy, Đỗ Khắc Thịnh, Dương Tấn Nhựt (2013) Nhân giống lan hài tam đảo (*Paphiopedilum graxtrixianum*) thông qua phát sinh protocorm-like body. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 11(3): 521-528.
- Vũ Quốc Luận, Nguyễn Phúc Huy, Hoàng Xuân Chiến, Trịnh Thị Hương, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Bá Nam, Đỗ Khắc Thịnh, Dương Tấn Nhựt (2012) Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây lan vân hài (*Paphiopedilum callosum*). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 10(3): 487-494.
- Vũ Quốc Luận, Trần Đình Phương, Trần Công Luận, Dương Tấn Nhựt (2015) Vi nhân giống và định tính hoạt chất β -sitosterol trên cây lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 13(4): 1113-1125.
- Vũ Quốc Luận, Vũ Thị Huyền Trang, Nguyễn Phúc Huy, Trần Hoàng Dũng, Dương Tấn Nhựt (2015) Ảnh giá đặc điểm hình thái, định danh phân tử và khả năng sinh trưởng, phát triển của một số giống lan hoàng thảo giả hạc (*Dendrobium* sp.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 13(2A): 469-476.
- Zhao D, 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.
- Zhu Y, Zhang A, He B, Zhang X, Yu Q, Si J (2010) Quantitative variation of total alkaloids contents in *Dendrobium officinale*. *China J Chinese Mate Med* 35(18): 2388-2391.
- Yao C, Hao R, Pan S, Wang Y (2012) Functional foods based on traditional chinese medicine. *Nutrition, Well-Being and Health* 179-200.

EFFECT OF FACTORS ON GROWTH AND DEVELOPMENT OF *DENDROBIUM OFFICINALE* KIMURA ET MIGO CULTURED *IN VITRO* AND *EX VITRO*

Vu Quoc Luan¹, Hoang Thanh Tung¹, Vu Thi Hien¹, Hoang Dac Khai¹, Do Manh Cuong¹, Trinh Thi Huong², Bui Van The Vinh³, Vu Thi Tu⁴, Duong Tan Nhut¹

¹Tay Nguyen Institute for Scientific Research, VAST

²Ho Chi Minh City University of Food Industry

³Ho Chi Minh City University of Technology (HUTECH)

⁴Yersin University

SUMMARY

Dendrobium officinale Kimura et Migo, a species of orchid for beautiful flowers, is used in traditional medicine in many Asian countries because there are many important pharmaceuticals

(chrysotoxene, erianin, confusarin, polysaccharide, alkaloid ...) in anti-cancer, anti-aging, boosting immunity and vasodilation, etc. In recent years, more than 4,000 hectares of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo artificial planting has been available in China and the price of dry product was around ¥ 80,000/kg. Currently, plantlet quality is an important factor influencing the acclimatization stage, growth, and development of plants in the greenhouse. In this study, the effect of a number of factors medium, plant regulator, ventilation, and substrate to improve plantlet quality as well as further growth and development in the greenhouse conditions were investigated. The results showed that SH medium was suitable for *in vitro* shoot growth in terms of monitoring parameters after 90 days of culture. In shoot multiplication stage, the shoots culture on SH medium supplemented with 2 mg/L BA, 30 g/L sucrose, 9 g/L agar, 1g /L activated charcoal (AC) gave the best results with 4.53 shoots/per shoot. The SH medium supplemented with 1.0 mg/L NAA, 30 g/L sucrose, 9 g/L agar, 1.0 g/L AC combined with ventilation conditions was suitable for rooting stage with plant height (5.73 cm), number of roots (4.77), root length (5.00 cm), fresh weight (3.36 g), dry weight (0,31 g), and total chlorophyll (SPAD) (45.76 nmol/cm²). Plantlets derived from culture ventilation conditions cultivated on the mixture of pine bark and fern fiber (50:50) was the highest survival rate (100%) and growth after 12 months in the greenhouse.

Keyword: *aeration system, Dendrobium officinale Kimura et Migo, plantlet quality, SH medium, substrate*