

## **NHÂN GIỐNG *IN VITRO* LOÀI LAN *DENDROBIUM FIMBRIATUM* HOOK. (HOÀNG THẢO LONG NHÃN)**

*In Vitro* Micropropagation of *Dendrobium Fimbriatum* Hook.

Nguyễn Thị Sơn, Nguyễn Thị Lý Anh, Vũ Ngọc Lan, Trần Thế Mai

*Viện Sinh học Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội*

Email của tác giả liên hệ: sonlinhchi@hua.edu.vn

Ngày gửi bài: 29.11.2011

Ngày chấp nhận: 25.03.2012

### **TÓM TẮT**

Lan *Dendrobium fimbriatum* Hook. (Hoàng thảo Long nhãn) là loài lan đẹp được sử dụng làm cảnh và làm thuốc, đang đe dọa tuyệt chủng. Tiến hành nghiên cứu nhân *in vitro* với mục đích bảo tồn và phát triển nguồn gen loài lan quý. Kết quả nghiên cứu đã chỉ rõ: Nguyên liệu sử dụng là quả lan 3 tháng tuổi; Môi trường thích hợp cho nảy mầm và phát sinh protocorm của hạt là môi trường MS + 100ml ND + 10g saccharoza + 6,0g agar/lít môi trường; Môi trường nhân nhanh protocorm tốt nhất là môi trường KC + 100ml ND + 10g sacaroza + 60g khoai tây + 6,0g agar/lít môi trường; Môi trường MS + 100ml ND + 20g sacaroza + 60g chuối chín + 6,0g agar/lít môi trường là thích hợp nhất cho nhân nhanh chồi *in vitro*; Môi trường tạo cây hoàn chỉnh là RE + 10g sacaroza + 1g THT + 6,0g agar/lít môi trường.

Từ khóa: *Dendrobium fimbriatum* Hook., quả lan, nhân nhanh, protocorm.

### **SUMMARY**

The orchid *Dendrobium fimbriatum* Hook (Hoang Thao Long Nhan), a beautiful orchid species, which is currently used for house decoration as well as medicine, is in danger of being extinction. In *in vitro* studies of orchid *Dendrobium fimbriatum* Hook. (Hoang Thao Long Nhan) were conducted in order to conserve and increase the genetic pool of this precious orchid species. The results showed that the suitable materials used for micropropagation were 3 months old fruits. Most suitable medium for germination and protocorm formation was MS+100ml ND+10g saccharose+6.0g agar/liter. The optimum medium for propagation of protocorms was KC +100ml ND+10g saccharose+60g potato+6.0g agar/liter. The most appropriate medium for fast *in vitro* propagation of shoots was MS+100ml ND+20g saccharose+60g ripe banana+6.0g agar/liter. The medium used for growing of complete plants was RE+10g saccharose +1g THT+6.0g agar/liter.

Keywords: *Dendrobium fimbriatum* Hook., fruit, propagations, protocorms.

### **1. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Loài lan *Dendrobium fimbriatum* Hook. (Hoàng thảo Long nhãn) được dùng làm cảnh vì hoa to, có hương thơm, màu vàng cam với môi xẻ tua, ở họng có một đốm màu nâu tím hoặc tím đỏ giống mắt rồng rất đẹp. Theo cuốn “Dược điển” Trung Quốc năm 1997, *D. fimbriatum* Hook. (Đỗ Huy Bích, 2004). Tuy nhiên, trong quá

trình phát triển kinh tế xã hội, do những nguyên nhân khác nhau, nhiều loài Hoàng thảo đã bị tuyệt chủng hoặc bị đe dọa tuyệt chủng. Một số loài lan thuộc chi lan Hoàng thảo đã có trong danh lục Đỏ của “Sách đỏ Việt Nam” Hoàng thảo Long nhãn (*Dendrobium fimbriatum* Hook.) được xếp ở mức VU (sắp nguy cấp) (Nguyễn Tiến Bản, 2007).

Đối với nhiều loài lan quý hiếm bị đe dọa tuyệt chủng trong tự nhiên thường được bảo tồn nhờ phương thức nảy mầm từ hạt (Kauth, 2005). Hiện nay, với công nghệ nhân giống *in vitro*, hệ số nhân giống từ một quả lan là rất lớn, từ vài ngàn đến một triệu cây con (Trần Văn Minh, 2001). Đã có các tác giả trong và ngoài nước nhân giống lan *Dendrobium* sp. bằng phương pháp gieo hạt lan trên nền môi trường MS có bổ sung 0,5mg/l NAA (Luan và cs., 2006). Nguyễn Văn Song (2011) cũng nhân nhanh *in vitro* loài lan rừng có nguy cơ tuyệt chủng với nguồn nguyên liệu ban đầu là gieo hạt trên môi trường MS + 15% đường sacarose + 2,0mg/l BA.

*Dendrobium fimbriatum* Hook. là loài lan quý, việc nghiên cứu và ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô để nhân *in vitro* loài lan này là hoàn toàn mới ở Việt Nam. Để góp phần bảo tồn và phát triển nguồn gen loài lan *Dendrobium fimbriatum* Hook. (một loài bị đánh giá là sắp nguy cấp và phải đối mặt với nguy cơ tuyệt chủng cao trong tự nhiên trong một tương lai không xa) thì việc nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài lan này là việc làm cấp thiết và có ý nghĩa.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Đối tượng, vật liệu, địa điểm và thời gian nghiên cứu

Đối tượng: Hoàng thảo long nhãn (*Dendrobium fimbriatum* Hook.) từ Viện Sinh học Nông nghiệp - Trường ĐH Nông Nghiệp Hà Nội nghiên cứu thu thập tại Lai Châu.

Vật liệu:

- Mẫu thí nghiệm: Quả lan *Dendrobium fimbriatum* Hook.

- Môi trường: Murashige & Shoog (1962), Vacin & Went (1949), Knudson C (1965), Robert Ernst (1979)

- Các dịch nghiên: Nước dừa (ND), táo, chuối, khoai tây, cà rốt ...

Cách làm dịch nghiên: quả táo đỏ, 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.

Địa điểm: Viện Sinh học Nông nghiệp - Trường Đại Học Nông Nghiệp Hà Nội - Trâu Quỳ - Gia Lâm - Hà Nội.

Thời gian nghiên cứu: 6 năm 2010 đến tháng 6 năm 2011

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Các phương pháp nuôi cấy mô hiện hành đã được sử dụng trong nghiên cứu.

- Bố trí thí nghiệm và các chỉ tiêu theo dõi, điều tra đều được tiến hành theo phương pháp nghiên cứu nông sinh học thông dụng.

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



Hình 1. Hoa lan *Dendrobium fimbriatum* Hook.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Khử trùng quả lan

Nhiều công trình nghiên cứu trong nước và trên thế giới đã công bố kết quả nghiên

cứu khử trùng mẫu quả của các giống lan (Hoàng Thị Nga, 2008; Phạm Thị Kim Hạnh và cộng sự, 2009). Kế thừa các kết quả đó, quả lan được khử trùng theo 3 công thức và cấy trên nền môi trường MS + 100ml ND + 10g sacaroza + 6g agar/lít. Các thí nghiệm khử trùng quả lan đều cho kết quả tối ưu, tỷ lệ mẫu sống vô trùng đạt 100%.

Ban đầu hạt lan có màu vàng nhạt và sau 6 tuần nuôi cấy trương lên và chuyển sang màu xanh tương tự loài lan rừng Kim Điệp (*Dendrobium chrytosotoxum*) theo mô tả của Nguyễn Văn Song (2011).

Cả 3 công thức đều cho kết quả tối ưu như nhau nhưng xét hiệu quả, các công đoạn thao tác thì CT1 (đốt bằng cồn 96<sup>o</sup> trong 1 phút) là tốt nhất. Sau 6 tuần nuôi cấy trên loài lan nghiên cứu thì 100% hạt được gieo trên môi trường MS + 100ml ND + 10g sacaroza + 6g agar/lít môi trường phát sinh protocorm.

### 3.2. Nhân nhanh protocorm

Hạt lan nảy mầm có thể sản xuất ra một khối tế bào chưa phân hoá rõ ràng được gọi là protocorm. Tất cả các protocorm này sẽ phát triển trong nhiều tuần, nhiều tháng thậm chí trong nhiều năm phụ thuộc từng loài cho đến khi đủ lớn để tạo chồi (McKendrick, 2000).

#### 3.2.1. Ảnh hưởng của nền môi trường nuôi cấy đến khả năng nhân nhanh protocorm.

Tiến hành thí nghiệm trên các nền môi trường dùng trong nuôi cấy mô được cho là thích hợp với các loài phong lan nói chung như: MS (Murashige & Shoog, 1962), VW (Vacin & Went, 1949), KC (Knudson, 1965), RE (Robert Ernst, 1979).

Các cụm protocorm thu được ở thí nghiệm trên được chọn lựa và cấy vào mỗi bình 03 cụm protocorm có đường kính 5mm và mỗi cụm mang 50 protocorm. Sau 8 tuần nuôi cấy, theo dõi thu được kết quả ở bảng 2.

**Bảng 1. Ảnh hưởng của phương pháp khử trùng quả đến tỷ lệ mẫu sống và hình thái protocorm (sau 6 tuần)**

Công thức	Tỷ lệ mẫu sống có phát sinh protocorm (%)	Hình thái protocorm
CT1 (Đốt bằng cồn 96 <sup>o</sup> trong 1 phút )	100	+++
CT2 (Cồn 96 <sup>o</sup> 1 phút + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2%) 5 phút)	100	+++
CT3 (Cồn 96 <sup>o</sup> 1 phút + HgCl <sub>2</sub> (0,1%) 5 phút)	100	+++

Ghi chú: +++ Kích thước protocorm đồng đều, màu sắc xanh của protocorm

**Bảng 2. Ảnh hưởng của nền môi trường nuôi cấy đến khả năng nhân nhanh protocorm (sau 8 tuần nuôi cấy)**

Công thức	Đường kính cụm (mm)	Số lượng protocorm/cụm	HSN protocorm (lần)
CT1: MS + 100mlND + 10g sacaroza + 6g agar/lít môi trường	19,33	189,00	3,78
CT2: VW + 100mlND + 10g sacaroza + 6g agar/lít môi trường	17,80	178,56	3,57
CT3: KC + 100mlND + 10g sacaroza + 6g agar/lít môi trường	20,50	205,33	4,11
CT4: RE + 100mlND + 10g sacaroza + 6g agar/lít môi trường	16,61	169,44	3,39
LSD <sub>0,05</sub>	1,71	16,46	0,34
CV %	4,9	4,7	4,8

Môi trường KC (CT3) cho tăng trưởng về đường kính cụm protocorm lớn nhất 20,5mm; số lượng protocorm lớn nhất đạt 205,33 protocorm/cụm và hệ số nhân (HSN) cao nhất 4,11 lần sau 8 tuần nuôi cấy về số liệu. Xét về HSN thì CT3 cũng cho hệ số nhân cao nhất. Tuy đường kính cụm protocorm, số lượng protocorm và HSN protocorm thu được ở CT3 sai khác có ý nghĩa với các CT2 và CT4 nhưng sai khác không có ý nghĩa với CT1 nhưng xét về mặt hiệu quả kinh tế thì CT3 môi trường KC là môi trường rẻ tiền và thông dụng trong nuôi cấy lan, chính vì thế môi trường KC là môi trường được lựa chọn trong nuôi cấy nhân nhanh protocorm lan *Dendrobium fimbriatum* Hook.

### 3.2.2. Ảnh hưởng của dịch nghiền củ, quả đến khả năng nhân nhanh protocorm.

Dịch khoai tây nghiền, dịch nghiền quả chuối, dịch nghiền cà rốt, dịch nghiền quả táo, ... được sử dụng để làm tăng sự phát

triển của mô sẹo hay cơ quan nuôi cấy trong nuôi cấy mô phong lan (Lê Văn Hoàng, 2007). Để biết được loại dịch nghiền nào là cần thiết cho giai đoạn nhân nhanh protocorm của giống lan *Dendrobium fimbriatum* Hook., thí nghiệm được tiến hành cấy vào mỗi bình 3 cụm protocorm có đường kính 5mm và mỗi cụm mang 50 protocorm được đưa vào nuôi cấy trên nền môi trường KC có bổ sung các dịch nghiền (khoai tây, cà rốt, táo, chuối). Kết quả theo dõi trong 8 tuần được thể hiện ở bảng 3.

Khi bổ sung riêng từng loại dịch nghiền khoai tây, cà rốt, táo, chuối với cùng lượng vào môi trường thì thấy dịch nghiền khoai tây (CT2) là hiệu quả đối với protocorm lan *Dendrobium fimbriatum* Hook. (đường kính cụm protocorm là 20,87mm; số lượng protocorm/cụm là 231,41 và HSN là 4,63 lần).

**Bảng 3. Ảnh hưởng của dịch nghiền củ, quả đến khả năng nhân nhanh protocorm (Sau 8 tuần nuôi cấy)**

Công thức	ĐK cụm (mm)	Số lượng protocorm/cụm	HSN protocorm (lần)	Hình thái mẫu
CT1(ĐC)	20,43	200,03	4,00	+,C
CT2: ĐC + 60g khoai tây/lít môi trường	20,87	231,41	4,63	++
CT3: ĐC + 60g cà rốt/lít môi trường	12,33	159,78	3,20	+++
CT4: ĐC + 60g táo/lít môi trường	12,17	157,33	3,15	+
CT5: ĐC + 60g chuối/lít môi trường	11,83	118,44	2,39	++,C,R
CT6: ĐC + 60g khoai tây + 60g cà rốt/lít môi trường	12,61	115,70	2,31	+++
CT7: ĐC + 60g khoai tây + 60g táo/lít môi trường	11,35	115,56	2,31	++
CT8: ĐC + 60g khoai tây + 60g chuối/lít môi trường	11,11	115,33	2,31	++,C
CT9: ĐC + 60g cà rốt + 60g táo/lít môi trường	10,98	113,89	2,28	++
CT10: ĐC + 60g cà rốt + 60g chuối/lít môi trường	10,06	113,44	2,27	++,C
CT11: ĐC + 60g táo + 60g chuối/lít môi trường	10,96	112,56	2,26	++,C,R
LSD <sub>0,05</sub>	1,04	11,27	0,24	
CV%	4,7	4,7	5,0	

Ghi chú: +++, ++, +: sắc xanh đậm, xanh và xanh nhạt của mẫu

C: xuất hiện chồi R: xuất hiện rễ

ĐC = Môi trường KC + 100ml ND + 10g sacarozơ + 6g agar/lít môi trường

Đối với các công thức có bổ sung kết hợp 2 loại dịch nghiền vào môi trường nuôi cấy (từ CT6 đến CT11), không cho kết quả vượt trội theo tính cộng hợp, thậm chí còn cho các chỉ tiêu đường kính cụm, số lượng protocorm và HSN thấp hơn so với các công thức bổ sung riêng từng loại dịch nghiền và thấp hơn đối chứng.

Như vậy, công thức CT2 (Môi trường KC + 100ml ND + 10g sacaroza + 60g khoai tây/lít môi trường) là công thức cho hệ số nhân protocorm đạt cao nhất 4,63 lần/sau 8 tuần nuôi cấy. Nghiên cứu nhân nhanh lan Kim Tuyền *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. cũng cho số HSN protocorm là cao nhất 5,33 lần sau 8 tuần nuôi cấy khi bổ sung 100 ml ND và 100g khoai tây vào môi trường KC (Phùng Văn Phê, 2010).

### 3.3. Nhân nhanh cụm chồi

#### 3.3.1. Ảnh hưởng của nền môi trường nuôi cấy đến khả năng nhân nhanh cụm chồi

Đối với loài lan *Dendrobium fimbriatum* Hook. trong giai đoạn nhân nhanh protocorm thì nền môi trường KC là tối ưu. Vậy ở giai đoạn nhân nhanh cụm chồi đối với loài này thích hợp với nền môi trường nào? Chúng tôi tiến hành trên 4 công thức.

Mỗi công thức cấy 3 bình, mỗi bình thí nghiệm 3 cụm chồi có đường kính 10 mm và

có chiều cao 10mm, mỗi cụm có chứa 15 chồi được đưa vào nuôi cấy tại các công thức thí nghiệm. Kết quả thể hiện qua bảng 4.

Thành phần các nguyên tố khoáng của môi trường MS (CT1) rất phù hợp cho quá trình tăng nhanh về số lượng chồi (45,07 chồi/cụm) và HSN chồi (3,0 lần) trong nuôi cấy cụm chồi của giống lan *Dendrobium fimbriatum* Hook. Môi trường KC (CT3) phù hợp cho nhân nhanh protocorm loài lan này nhưng trong nhân nhanh cụm chồi lại không phù hợp (số lượng chồi chỉ đạt 41,22 chồi/cụm và HSN chồi là 2,75 lần). Môi trường VW và RE cũng không phù hợp trong nuôi cấy lan *Dendrobium fimbriatum* Hook. Môi trường VW (CT2) có chỉ tiêu số chồi/cụm là 39,67 và HSN là 2,64 lần. Môi trường RE (CT4) cho số chồi/cụm (38,37 chồi) và HSN (2,56 lần) là thấp nhất sau 8 tuần nuôi cấy.

Ở mức độ tin cậy 95% số chồi/cụm và HSN chồi ở CT1 sai khác có ý nghĩa so với các công thức khác. Như vậy, môi trường nuôi cấy được lựa chọn trong nhân nhanh cụm chồi lan *Dendrobium fimbriatum* Hook. là nền môi trường MS. Khi nhân giống địa lan Hồng Hoàng (*Cymbidium iridioides*) tác giả cũng đã dùng nền là môi trường MS bổ sung 15% ND (Hoàng Thị Nga, 2008).

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

Công thức	Số chồi/cụm	HSN chồi (lần)	Hình thái cụm chồi
CT1: MS + 100mlND + 10g sacaroza + 6g agar/lít môi trường	45,07	3,00	++, b
CT2: VW + 100mlND + 10g sacaroza + 6g agar/lít môi trường	39,67	2,64	++, c
CT3: KC + 100mlND + 10g sacaroza + 6g agar/lít môi trường	41,22	2,75	++, b
CT4: RE + 100mlND + 10g sacaroza + 6g agar/lít môi trường	38,37	2,56	++, c
LSD <sub>0,05</sub>	3,6	0,2	
CV %	4,6	3,9	

Ghi chú: ++: Sắc xanh của cụm chồi; b: Thân trung bình; c: Thân mảnh

**3.3.2. Ảnh hưởng của dịch nghiền củ, quả đến khả năng nhân nhanh cụm chồi**

Cấy vào mỗi bình thí nghiệm 3 cụm chồi có đường kính 10mm và có chiều cao 10mm, mỗi cụm có chứa 15 chồi được đưa vào nuôi cấy trên nền môi trường MS (Murashige and Skoog, 1960) có bổ sung các dịch nghiền (khoai tây, cà rốt, táo, chuối) qua đó xác định được ảnh hưởng của các chất bổ sung này đến khả năng nhân nhanh của cụm chồi. Kết quả được thể hiện ở bảng 5.

Kết quả cho thấy ở các công thức bổ sung riêng lẻ các dịch nghiền vào môi trường nuôi cấy thì CT5 (60 gam chuối chín/lít môi trường) cho số chồi/cụm nhiều nhất (51,56 chồi/cụm) và HSN chồi cao nhất (đạt 3,44 lần). Các công thức có bổ sung kết hợp các dịch nghiền vào môi trường nuôi cấy không

cho kết quả vượt trội theo tính cộng hợp mà ở các công thức từ CT6-CT11 đều cho các chỉ tiêu số chồi/cụm và HSN chồi thấp hơn CT5. Điều này cho thấy việc kết hợp các chất tự nhiên vào cùng môi trường nhân chồi không mang lại hệ số nhân chồi tăng cao như mong muốn. Ở mức độ tin cậy 95%, số chồi/cụm thu được và HSN chồi đạt được sau 8 tuần nuôi cấy ở công thức 5 cao hơn so với các công thức khác. Môi trường MS + 100ml ND + 20g saccaroza + 6g agar + 60g chuối chín/lít môi trường là tối ưu cho nhân nhanh cụm chồi loài lan nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu trên lan hải Hạng (*Paphiopedilum hangianum* Gurss.) khi nhân nhanh chồi thì cần bổ sung lượng chuối cao hơn lên đến 100g chuối/lít môi trường (Hoàng Thị Giang, 2010).

**Bảng 5. Ảnh hưởng của dịch nghiền củ, quả đến khả năng nhân nhanh cụm chồi (sau 8 tuần nuôi cấy)**

Công thức	Số chồi/cụm	HSN chồi (lần)	Hình thái mẫu
CT1(ĐC)	46,78	3,12	+, c
CT2: ĐC + 60g khoai tây/lít môi trường	47,26	3,15	+, c
CT3: ĐC + 60g cà rốt/lít môi trường	42,93	2,86	++, c
CT4: ĐC + 60g táo/lít môi trường	46,89	3,13	++, b
CT5: ĐC + 60g chuối/lít môi trường	51,56	3,44	++, a
CT6: ĐC + 60g khoai tây + 60g cà rốt/lít môi trường	43,11	2,87	++, b
CT7: ĐC + 60g khoai tây + 60g táo/lít môi trường	43,37	2,89	++, b
CT8: ĐC + 60g khoai tây + 60g chuối/lít môi trường	44,70	2,98	++, b
CT9: ĐC + 60g cà rốt + 60g táo/lít môi trường	47,04	3,14	++, b
CT10: ĐC + 60g cà rốt + 60g chuối/lít môi trường	47,22	3,15	++, b
CT11: ĐC + 60g táo + 60g chuối/lít môi trường	47,56	3,17	++, b
LSD <sub>0,05</sub>	3,43	0,24	
CV %	4,8	4,6	

Ghi chú: ++, +: Sắc xanh vừa, xanh nhạt của cụm chồi

a: Thân mập; b: Thân trung bình; c: Thân mảnh

ĐC = Môi trường MS + 100ml ND+ 20g saccaroza + 6g agar/lít môi trường

### 3.4. Tạo cây hoàn chỉnh

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

Đây là giai đoạn cuối cùng của quá trình nhân nhanh *in vitro*. Với mục đích tạo cây con có sức sống cao, đạt tiêu chuẩn ra cây. Các môi trường trên đã được thử nghiệm cho sự sinh trưởng phát triển của cây lan *in vitro* và tiến hành lấy chồi thu được từ các thí nghiệm trên tách riêng rẽ cấy trên 4 công thức, mỗi công thức cấy 3 bình, mỗi bình cấy 3 chồi, mỗi chồi có chiều cao 3cm, 3 lá. Kết quả được thể hiện qua bảng 6.

Kết quả bảng 6 cho thấy: Ở CT4 sử dụng nền khoáng RE cho khả năng phát triển về chiều cao cây, số lá là cao nhất (đạt chiều cao 5,22 cm/cây; 5,41 lá/cây) và chất lượng cây tốt.

Ở độ sai khác tin cậy 95%, công thức 4 cho sinh trưởng cây tốt nhất hơn hẳn các công thức khác. Nền môi trường nuôi cấy phù hợp nhất cho sinh trưởng của cây lan

*Dendrobium fimbriatum* Hook. là nền môi trường RE.

#### 3.4.2. Ảnh hưởng của than hoạt tính (THT) đến khả năng ra rễ của chồi

Bổ sung THT vào môi trường nuôi cấy, ở giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh rất có hiệu quả với các loài phong lan. THT có thể làm chậm quá trình hấp phụ một số chất điều tiết sinh trưởng, dinh dưỡng cần thiết khác và thúc đẩy tạo cây hoàn chỉnh. Ngoài ra THT khi được bổ sung vào môi trường còn có tác dụng tạo độ xốp và tạo độ tối cho môi trường rất phù hợp cho quá trình ra rễ của mẫu chồi cây. Để nghiên cứu ảnh hưởng của THT đến khả năng ra rễ của chồi lan *Dendrobium fimbriatum* Hook. Thí nghiệm được tiến hành theo 5 công thức bổ sung hàm lượng THT khác nhau vào môi trường RE. Mỗi công thức cấy 3 bình, mỗi bình cấy 3 chồi cây, mỗi chồi cây có chiều cao 3cm; 3 lá được cấy vào các công thức thí nghiệm. Sau 30 ngày nuôi cấy đã thu được kết quả ở bảng 7.

**Bảng 6. Ảnh hưởng của nền môi trường nuôi cấy đến sinh trưởng của chồi (sau 8 tuần nuôi cấy)**

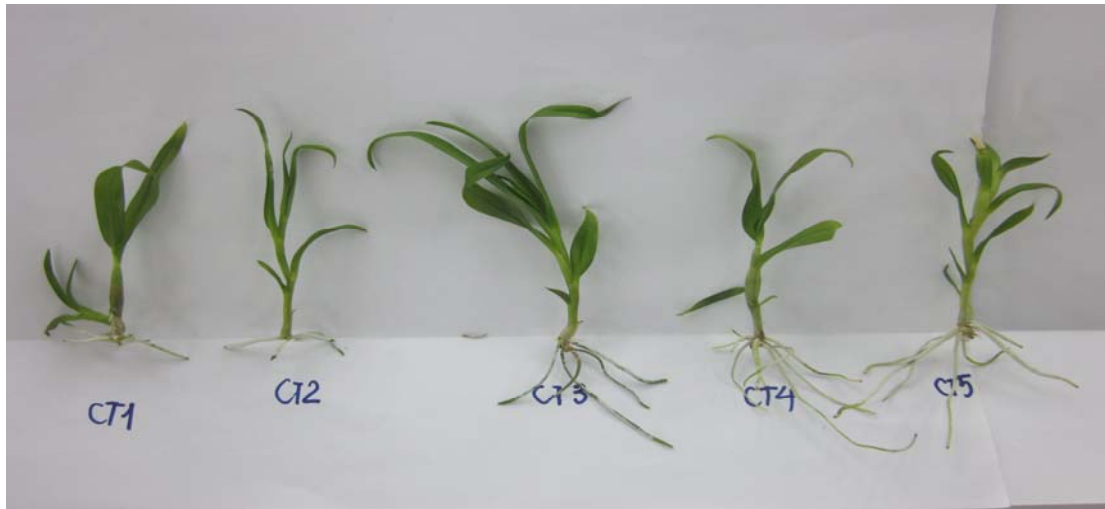
Công thức	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây	Chất lượng cây
CT1: MS + 10g sacaroza + 6g agar/lít môi trường	4,02	4,63	+++
CT2: VW + 10g sacaroza + 6g agar/lít môi trường	3,11	3,59	+++
CT3: KC + 10g sacaroza + 6g agar/lít môi trường	3,30	3,89	+++
CT4: RE + 10g sacaroza + 6g agar/lít môi trường	5,22	5,41	+++
LSD <sub>0,05</sub>	0,33	0,37	
CV %	4,4	4,4	

Ghi chú: +++ Tốt (xanh, mập, có 3-5 rễ)

**Bảng 7. Ảnh hưởng của THT đến khả năng ra rễ của chồi (sau 30 ngày nuôi cấy)**

Công thức	Tỷ lệ tạo rễ (%)			Số rễ	Chiều dài rễ (cm)
	Sau 10 ngày	Sau 20 ngày	Sau 30 ngày		
CT1 (ĐC)	0	7,40	81,48	1,15	1,37
CT2: ĐC + 0,5g THT/lít môi trường	0	18,51	100,00	2,37	2,65
CT3: ĐC + 1,0g THT/lít môi trường	0	48,14	100,00	5,67	2,87
CT4: ĐC + 1,5g THT/lít môi trường	0	55,56	100,00	3,33	3,32
CT5: ĐC + 2,0g THT/lít môi trường	0	62,96	100,00	3,48	3,66
LSD <sub>0,05</sub>				0,27	0,3
CV %				4,6	4,7

Ghi chú: ĐC = Môi trường RE + 10g sacaroza + 6g agar/lít môi trường



Hình 2. Ảnh hưởng của THT đến khả năng ra rễ của chồi

Kết quả bảng 7 cho thấy tất cả các công thức có bổ sung THT sau 30 ngày nuôi cấy cho tỷ lệ chồi tạo rễ 100%. CT3 có bổ sung 1g THT/lít môi trường nuôi cấy cho số rễ nhiều nhất là 5,67. Tuy nhiên, trên môi trường có bổ sung THT nhiều hơn 1,0g/lít môi trường chiều cao cây thấp dần, điều này có thể do THT đã hấp phụ một số chất điều tiết sinh trưởng và dinh dưỡng cần thiết nên cây sinh trưởng chậm.

Vậy bổ sung vào môi trường nuôi cấy chồi lan *Dendrobium fimbriatum* Hook. 1,0g THT/lít môi trường nuôi cấy là tối ưu cho việc tạo rễ *in vitro*.

#### 4. KẾT LUẬN

- Nguồn vật liệu ban đầu là quả lan, chế độ khử trùng tối ưu là nhúng quả trong cồn 96° rồi hơ trên ngọn lửa đèn cồn và cấy trên nền môi trường MS + 100ml ND + 10g sacaroza + 6g agar/lít môi trường

- Môi trường tối ưu nhân nhanh protocorm là nền môi trường KC + 100ml ND + 10g sacaroza + 60g khoai tây/lít môi trường đạt hệ số nhân 4,63 lần/sau 8tuần nuôi cấy.

- Môi trường tối ưu nhân nhanh cụm chồi là nền môi trường MS + 100ml ND + 20g sacaroza + 90g chuối chín/lít môi trường đạt hệ số nhân 3,44 lần/sau 8 tuần nuôi cấy.

- Môi trường nuôi cấy tối ưu cho việc tái sinh tạo cây hoàn chỉnh của loài lan *Dendrobium fimbriatum* Hook. là nền môi trường RE + 10g sacaroza + 1,0g THT + 6g agar/lít môi trường.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Tiến Bân và nhiều tác giả (2007). Sách Đỏ Việt Nam, Phần Thực vật; NXB. Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.
- Đỗ Huy Bích (2004). Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam - NXB Khoa học kỹ thuật, tr. 803-806.
- Hoàng Thị Giang, Nguyễn Quang Thạch, Mạch Hồng Thắm, Đỗ Thị Thu Hà (2010). Nghiên cứu nhân giống *in vitro* và nuôi trồng giống lan hài quý *P. hangianum perner* Guss (Hài Hạng) thu thập ở Việt Nam. Tạp chí Khoa học và Phát triển - Tập 8, số 2, tr.194-201.
- Lê Văn Hoàng (2007). Giáo trình nuôi cấy mô tế bào thực vật. Đại học Đà Nẵng.
- Trần Văn Minh, Nguyễn Văn Uyên (2001). Vi nhân giống phong lan nhóm *Dendrobium* trên quy mô công nghiệp, nhân giống *in vitro*. Tạp chí Khoa học Công nghệ, số 1, tr1-9.



- Hoàng Thị Nga, Nguyễn Quang Thạch, Đỗ Đức Thịnh, Hoàng Minh Tú (2008). Xây dựng quy trình nhân nhanh giống địa lan Hồng hoàng (*Cymbidium iridioides*) bằng kỹ thuật nuôi cấy mô. Tạp chí Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp số 4 tr.387-394.
- Nguyễn Văn Song (2011). Nhân nhanh in vitro lan Kim Điệp (*Dendrobium chrysotoxum*) - một loài lan rừng có nguy cơ tuyệt chủng. Tạp chí khoa học ĐH Huế số 64, tr.127-136.
- 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* (Wall.) Lindl. Tạp chí Khoa học ĐHQG, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ 26, tr.248-253.
- Kauth P. (2005). In vitro seed germination and seedling development of *Calopogon tuberosus* and *Sacoila lanceolata* var. *lanceolata*: Two Florida native terrestrial orchids, Master thesis, University of Florida.
- Luan VQ, Thien NQ, Khiem DV and Nhut DT (2006). In vitro germination capacity and plant recover of some native and rare orchids, Proceedings of International Workshop on Biotechnology of Agriculture, 175-177.
- McKendrick (2000). *In vitro* germination of orchids: a manual, Ceiba Foundation for Tropica Conservation, 1-17