

NHÂN GIỐNG *IN VITRO* LAN PHI ĐIỆP TÍM (*Dendrobium anosmum*)

Nguyễn Quỳnh Trang, Vũ Thị Huệ, Khuất Thị Hải Ninh, Nguyễn Thị Thor

ThS. Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Từ nguồn vật liệu ban đầu là quả Lan Phi điệp tím (*Dendrobium anosmum*), đã xây dựng thành công quy trình tạo cây con bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. Quả lan được khử trùng bề mặt bằng HgCl_2 0,1% trong 7 phút và khử trùng bằng NaOCl 5% trong 15 phút cho tỷ lệ mẫu sạch đạt và mẫu tái sinh cao nhất. Môi trường Knuds có bổ sung 0,3 mg/l NAA + 0,3 mg/l Kinetin + 0,3mg/l BAP cho hệ số nhân nhanh thể chồi đạt 5,8 lần/3 tuần, chất lượng thể chồi tốt. Sau 4 tuần, công thức bổ sung 30 g/l sucrose + 0,5 mg/l GA_3 + 0,1 mg/l Kinetin chồi tăng trưởng tốt nhất (2,45 cm), chất lượng chồi tốt. Công thức bổ sung 0,5 mg/l IBA và công thức 0,3 mg/l IBA + 0,1 mg/l NAA cho tỷ lệ chồi ra rễ đạt 98%, số rễ trung bình đạt trên 3 rễ/ chồi, chất lượng rễ tốt. Khi cây có chiều cao > 4 cm, có 3-4 rễ đem bình cây ra huấn luyện ở điều kiện tự nhiên 1 tuần, rửa sạch thạch, đưa cây ra trồng trên giá thể.

Từ khóa: *Dendrobium anosmum*, *in vitro*, Knuds, nhân giống, thể chồi

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hoa lan từ lâu đã được sử dụng làm loài cây cảnh quý giá, không những đẹp về màu sắc mà cả về hình dáng, từ đường nét của cánh hoa tạo nên đến hình dạng thân, lá cảnh duyên dáng, hiếm có loài hoa nào sánh nổi, một số loài còn có hương thơm quyến rũ, thanh tao... Vì vậy, từ lâu ông cha ta luôn coi hoa lan như một biểu tượng của sự thuần khiết, sự cao quý và vương giả

Chi lan *Dendrobium* có hoa rất đẹp, chu kỳ hoa ngắn, hoa tươi lâu, dáng cong buông thong. Ngoài giá trị làm cảnh, chi lan này còn có giá trị làm thuốc để trị nhiều bệnh về da. Lan Phi điệp tím (*Dendrobium anosmum*) là loài lan quý, có giá trị kinh tế cao, hoa mọc thành từng chùm buông xuống với nhiều hoa nhỏ màu tím và có hương thơm dễ chịu. Do vậy, loài lan này từ lâu đã là đối tượng sưu tầm của nhiều người chơi lan và nuôi trồng lan.

Tuy nhiên, trong tự nhiên nội nhũ của lan thường bị tiêu giảm và muốn nảy mầm phải có sự xuất hiện của nấm cộng sinh *Rhizoctonia* nên khả năng tự nảy mầm là rất thấp. Bên cạnh đó, nhân giống hoa lan bằng con đường sinh dưỡng thường rất chậm, hệ số nhân giống thấp và ảnh hưởng lớn tới cây mẹ. Hiện nay, với công nghệ nhân giống *in vitro*, hệ số nhân giống từ một quả lan là rất lớn (Trần Văn

Minh, 2001). Do đó, nhân giống *in vitro* hoa lan từ phôi hạt trong ống nghiệm là khá hoàn hảo. Đã có nhiều tác giả trong và ngoài nước nhân giống lan *Dendrobium*. Trong đó, Nguyễn Thị Sơn và cộng sự, (2011) đã xây dựng được quy trình nhân giống *in vitro* Lan Hoàng thảo Long nhãn (*Dendrobium fimbriatum* Hook.); 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 + 2,0 mg/l IBA. Trước thực tế đó, việc nghiên cứu nhân giống Lan Phi điệp tím bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* là rất cần thiết.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu: Quả lan Phi điệp tím chín sinh lý thu từ vườn lan ở Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại cấy trong 10 bình trụ dung tích 200ml.

Vô trùng mẫu: Quả lan được rửa sạch bằng dung dịch xà phòng loãng, sau đó khử trùng sơ bộ bề mặt quả bằng ethanol 70% trong 2 phút, loại bỏ ethanol và tráng quả bằng nước cất vô trùng. Dùng HgCl_2 0,1% để tiếp tục khử trùng trong thời gian: 5, 7 và 9 phút hoặc NaOCl 5% trong 10, 15 hoặc 20 phút. Tráng mẫu bằng

nước cất vô trùng 3 - 5 lần. Sau khi khử trùng quả được tách đôi để lấy phôi hạt cây vào môi trường nuôi cấy khởi đầu.

Nhân nhanh, kích thích tăng trưởng chồi và tạo rễ: Sau 6-8 tuần phôi nảy mầm tạo thể chồi, cấy chuyển thể chồi sang môi trường nhân nhanh và kích thích tăng trưởng chồi. Khi chồi có chiều cao >3 cm được cấy chuyển sang môi trường tạo rễ.

Tất cả các môi trường nuôi cấy đều được sử dụng môi trường cơ bản Knuds, có bổ sung 30 g/l sucrose + 100 g/l dịch chiết khoai tây + 100 ml/l nước dừa non + 7 g/l agar + các loại và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng khác nhau tùy vào từng giai đoạn nuôi cấy. Môi trường

nuôi cấy được điều chỉnh pH = 5,6 - 5,8, khử trùng ở 121°C, áp suất 1atm trong 20 phút. Điều kiện nuôi cấy: Nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$; cường độ ánh sáng 2000 lux; thời gian chiếu sáng: 10 giờ/ngày.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của loại hóa chất, thời gian khử trùng đến khả năng tạo mẫu sạch và thể chồi

Quả lan sau khi làm sạch được khử trùng bằng NaOCl 5% và HgCl₂ 0,1% trong các khoảng thời gian khác nhau. Kết quả quá trình thực nghiệm được trình bày tại bảng 01.

Bảng 01. Ảnh hưởng của loại hóa chất, thời gian khử trùng đến khả năng tạo mẫu sạch và thể chồi

CTTN	Chất khử trùng	Thời gian khử trùng (phút)	Số bình mẫu cấy	Số bình mẫu sạch	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)
PĐ A1	HgCl ₂ 0,1%	5	12	4	33,33	33,33
PĐ A2		7	21	18	85,71	56,56
PĐ A3		9	21	20	95,25	23,81
PĐ A4	NaOCl 5%	10	8	1	12,50	10,37
PĐ A5		15	12	8	66,67	60,0
PĐ A6		20	12	8	66,67	46,67

Tỷ lệ mẫu sạch ở tất cả các CTTN đều tăng khi thời gian khử trùng tăng và đạt cao hơn với nhóm công thức khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% (33,33-95,25%), thấp hơn là nhóm công thức khử trùng bằng NaOCl 5% (12,50-66,67%). Tuy nhiên, khi sử dụng HgCl₂ 0,1% để khử trùng, tỷ lệ mẫu sạch càng cao thì tỷ lệ mẫu tái sinh càng giảm. Nguyên nhân là do HgCl₂ là chất độc, nếu thời gian khử trùng quá lâu hóa chất sẽ khiến phôi hạt bị độc nên không thể tái sinh được. Trong khi đó, khử trùng bằng NaOCl, tỷ lệ mẫu tái sinh lại khá đồng đều. Căn cứ vào kết quả đó có thể chọn ra công thức khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% trong 7 phút

và khử trùng bằng NaOCl 5% trong 15 phút.

3.2. Ảnh hưởng của loại và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng đến nhân nhanh thể chồi lan Phi Điệp tím

Thí nghiệm được tiến hành với 09 công thức có bổ sung các loại chất điều hòa sinh trưởng (BAP, Kinetin, NAA) ở các nồng độ khác nhau (0,1-0,3 mg/l). Kết quả thí nghiệm sau 3 tuần cho thấy: Hệ số nhân nhanh thể chồi có sự khác biệt rõ rệt ở các công thức thí nghiệm (đạt từ 1,4-5,8 lần). Nhìn chung, khi bổ sung riêng rẽ từng loại chất điều hòa sinh trưởng, hệ số nhân nhanh thể chồi thấp hơn so với khi phối hợp cả BAP, Kinetin và NAA. Ở

môi trường sử dụng tổ hợp 0,3 mg/lNAA + 0,3mg/l Kinetin + 0,3mg/l BAP cho hệ số nhân nhanh thể chồi đạt cao nhất (5,8 lần/3 tuần), chất lượng thể chồi tốt, chồi to, mập.

Bảng 02. Ảnh hưởng phối hợp của BAP, Kinetin và NAA đến khả năng nhân nhanh thể chồi Lan phi điệp tím

CTTN	Hàm lượng CĐHST (mg/l)			Số bình ban đầu	Số bình sau cấy chuyển	Hệ số nhân nhanh	Đặc điểm thể chồi
	BAP	Kinetin	NAA				
PĐ B1	0,1	0,1	0	5	7	1,4	Thể chồi nhỏ, màu xanh nhạt
PĐ B2	0,1	0,3	0	5	15	3,0	Thể chồi nhỏ, màu xanh nhạt
PĐ B3	0,3	0,1	0	5	14	2,8	Thể chồi nhỏ, màu xanh
PĐ B4	0,3	0,3	0	5	16	3,2	Thể chồi TB, màu xanh đậm
PĐ B5	0,1	0,1	0,1	5	13	2,6	Thể chồi nhỏ, màu xanh đậm
PĐ B6	0,1	0,3	0,1	5	15	3,0	Thể chồi nhỏ, màu xanh đậm
PĐ B7	0,3	0,1	0,1	5	16	3,2	Thể chồi TB, màu xanh đậm
PĐ B8	0,3	0,3	0,1	5	23	4,6	Thể chồi to, màu xanh đậm
PĐ B9	0,3	0,3	0,3	5	29	5,8	Thể chồi to, màu xanh đậm

3.3. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng kích thích tăng trưởng của chồi lan Phi điệp tím

Bảng 03. Ảnh hưởng phối hợp của BAP, Kinetin và GA₃ đến khả năng kích thích tăng trưởng chồi lan Phi Điệp tím

CTTN	Chất ĐHST (mg/l)			Số lá tăng trung bình/chồi	Chiều cao chồi tăng trung bình/chồi (cm)	Chất lượng chồi
	BAP	Kinetin	GA ₃			
ĐC	0	0	0	0,33	0,43	Chồi nhỏ, xanh nhạt
PĐ 1			0,1	1,67	0,70	Chồi nhỏ, xanh đậm
PĐ 2			0,3	0,66	0,80	Chồi nhỏ, xanh nhạt
PĐ 3			0,5	1,33	1,33	Chồi TB, xanh đậm
PĐ 4	0,1		0,1	2,00	1,74	Chồi TB, xanh nhạt
PĐ 5	0,1		0,3	2,33	1,90	Chồi nhỏ, xanh nhạt
PĐ 6	0,1		0,5	2,00	2,07	Chồi TB, xanh đậm
PĐ 7		0,1	0,1	2,33	2,03	Chồi TB, xanh đậm
PĐ 8		0,1	0,3	2,23	2,35	Chồi TB, xanh đậm
PĐ 9		0,1	0,5	2,22	2,45	Chồi to, xanh đậm
PĐ 10	0,1	0,1	0,1	1,67	1,87	Chồi TB, xanh nhạt
PĐ 11	0,1	0,1	0,3	1,66	2,00	Chồi TB, xanh nhạt

Thí nghiệm được tiến hành với 04 công thức nghiên cứu về hàm lượng đường (10, 20, 30 và 40 g/l) và 11 công thức môi trường nghiên cứu về tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng (BAP 0,1mg/l; Kinetin 0,1 mg/l; GA₃ 0,1-0,5 mg/l) để nghiên cứu khả năng kích thích tăng trưởng chồi lan Phi điệp tím. Kết quả thu được sau 3 tuần cho thấy, chiều cao chồi trung bình sau khi cấy tăng lên khi hàm lượng đường trong môi trường tăng từ 10-30 g/l (10 g/l sucrose chiều cao chồi đạt 0,47 cm, 20 g/l sucrose đạt 2,06

cm, 30 g/l sucrose đạt 2,77 cm) và giảm xuống khi tiếp tục tăng hàm lượng đường lên 40 g/l (đạt 2,53 cm). Tiếp tục bổ sung các loại chất điều hòa sinh trưởng ở nồng độ khác nhau, chiều cao chồi cũng có sự khác biệt rõ rệt, thay đổi từ 0,43-2,45 cm. Ở tất cả công thức khi càng tăng nồng độ GA₃, chiều cao chồi càng tăng và công thức bổ sung 30g/l sucrose + 0,5 mg/l GA₃ + 0,1 mg/l Kinetin chồi tăng trưởng tốt nhất (2,45 cm), chất lượng chồi tốt.

3.4. Ảnh hưởng của loại và nồng độ các chất ĐHST đến khả năng ra rễ của chồi lan

Bảng 04. Ảnh hưởng của loại và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng ra rễ

CTTN	Chất ĐHST (mg/l)			N (chồi)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ TB/ chồi (rễ)	Chiều dài rễ TB (cm)	Chất lượng rễ
	IBA	IAA	NAA					
ĐC	0	0	0	30	19,67	0,80	0,23	Xấu
R1	0,1	-	-	30	88,67	2,93	0,53	TB
R2	0,3	-	-	30	92,33	3,03	0,73	TB
R3	0,5	-	-	30	97,33	3,17	1,0	Tốt
R4	-	0,1	-	30	59,33	1,37	0,37	Xấu
R5	-	0,3	-	30	60,67	1,37	0,43	Xấu
R6	-	-	0,1	30	81,67	2,50	0,7	TB
R7	-	-	0,3	30	81,67	2,90	0,88	TB
R8	-	-	0,5	30	89,00	2,97	0,9	Tốt
R9	0,3	-	0,1	30	98,67	3,33	1,1	Tốt
R10	0,1	-	0,3	30	95,00	2,97	1,0	Tốt

Thí nghiệm được tiến hành với 10 công thức môi trường nghiên cứu về tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng (NAA 0,1-0,5 mg/l; IBA 0,1-0,5 mg/l; IAA 0,1-0,3 mg/l). Sau 3 tuần theo dõi kết quả thu được cho thấy tỷ lệ chồi ra rễ ở tất cả thí nghiệm có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng đều đạt khá cao (59,33-98,67%) và khác biệt rõ rệt với công thức ĐC (không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng). IBA và NAA đều thích hợp để kích thích tạo rễ chồi lan Phi điệp tím. Công thức bổ sung 0,5mg/l IBA và công thức 0,3 mg/l IBA + 0,1 mg/l NAA là hai

công thức tốt nhất cho tỷ lệ chồi ra rễ đạt 98 %, tạo trên 3 rễ/ chồi, chất lượng rễ tốt.

3.5. Ảnh hưởng của thời gian huấn luyện đến khả năng sống của cây lan khi ra cây

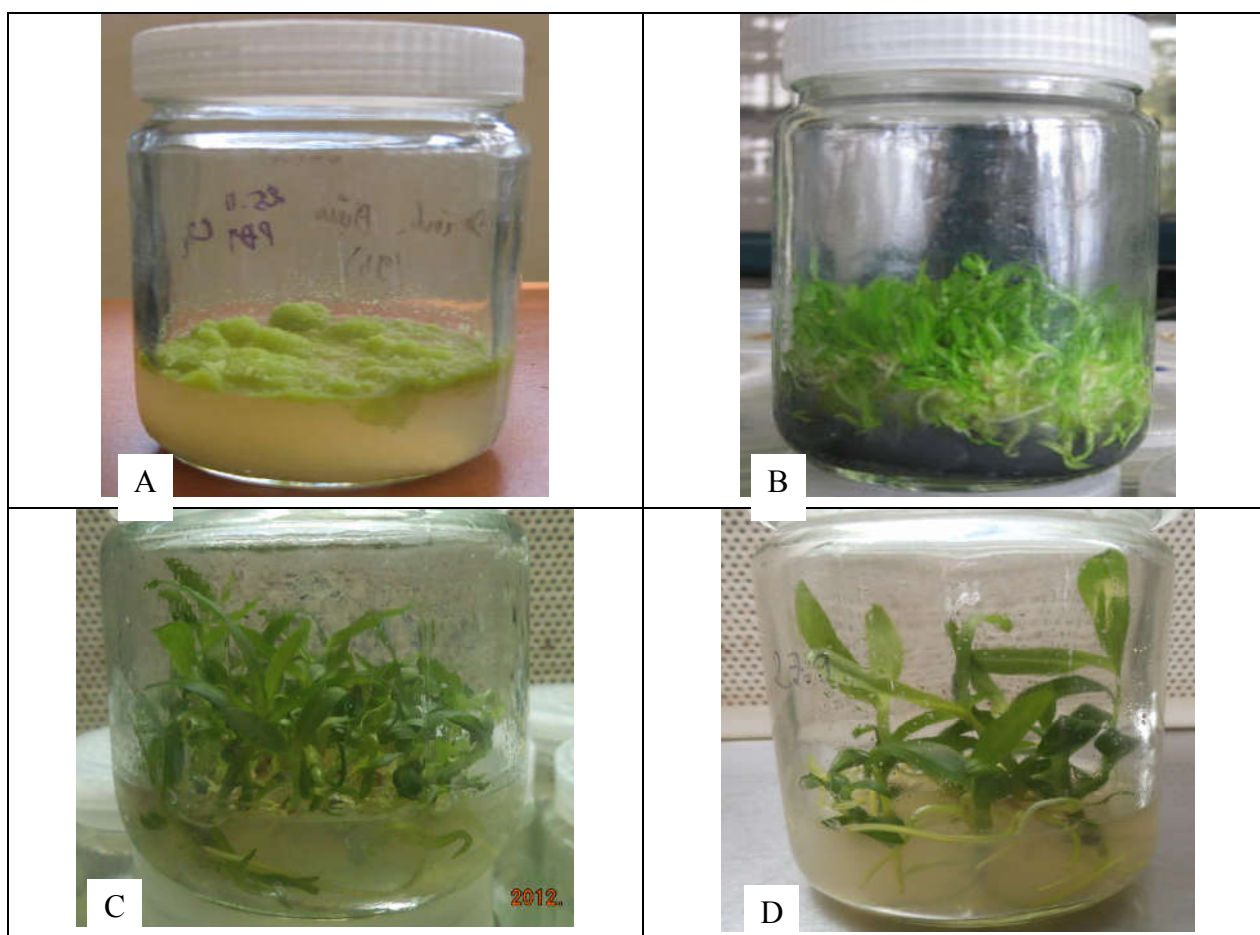
Khi cây có chiều cao > 4 cm, có 3-4 rễ đủ tiêu chuẩn, cây cứng cáp đem bình cây ra huấn luyện ở điều kiện tự nhiên. Thời gian huấn luyện được tiến hành với 04 công thức thời gian, sau đó cây con được đem ra trồng trên giá thể là Dulong xỉ. Sau 3 tuần theo dõi kết quả thu được cho thấy: Tuy tỷ lệ sống không có sai

khác rõ rệt giữa công thức đối chứng (không huấn luyện) với các công thức còn lại nhưng cây con có trải qua huấn luyện khả năng thích ứng với môi trường tự nhiên tốt hơn, rễ sớm

bám giá thể nên cây cứng cáp hơn. Thời gian huấn luyện 10 ngày, tỷ lệ sống của cây khi trồng ra giá thể đạt 100%, rễ bám giá thể tốt và bắt đầu sinh trưởng.

Bảng 05. Thời gian huấn luyện đến khả năng sống của lan khi ra cây

CTTN	Số cây	Tỷ lệ cây sống (%)	Chất lượng cây
ĐC	30	90,00	Cây cao 4,5-5,5 cm, cây nhỏ, thân yếu, rễ bám giá thể yếu
5 ngày	30	96,67	Cây cao 5,5-6 cm, thân cứng, rễ bắt đầu bám giá thể
10 ngày	30	100,00	Cây cao 6-6,5 cm, lá xanh đậm, cây cứng cáp, rễ bám giá thể tốt
15 ngày	30	100,00	Cây to khỏe, lá xanh đậm, rễ bám giá thể tốt và xuất hiện rễ mới, tăng chiều cao cây.



Hình 1. Một số hình ảnh về kết quả nghiên cứu

A - thể chồi hình thành sau 4 tuần; B - thể chồi sau giai đoạn nhân nhanh;
C - chồi lan sau giai đoạn kích thích tăng trưởng chồi; D - cây lan hoàn chỉnh

IV. KẾT LUẬN

(1) Khử trùng vật liệu nuôi cấy bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 7 phút và khử trùng bằng $NaOCl$

5% trong 15 phút cho tỷ lệ mẫu sạch và mẫu tái sinh cao nhất.

(2) Môi trường Knuds có bổ sung 0,3

mg/INAA + 0,3 mg/l Kinetin + 0,3 mg/l BAP cho hệ số nhân nhanh thể chồi đạt cao nhất (5,8 lần), chất lượng thể chồi tốt, chồi to, mập.

(3) Môi trường Knuds có bổ sung 30 g/l sucrose + 0,5 mg/l GA₃ + 0,1 mg/l Kinetin cho chồi tăng trưởng cao nhất (2,45 cm), chất lượng chồi tốt.

(4) Môi trường Knuds có bổ sung 0,5 mg/l IBA hoặc bổ sung 0,3 mg/l IBA + 0,1 mg/l NAA là hai công thức tốt nhất cho tỷ lệ chồi ra rễ đạt 98%, tạo trên 3 rễ/chồi, chất lượng rễ tốt.

(5) Thời gian huấn luyện 10 ngày, tỷ lệ sống của cây khi trồng ra giá thể đạt 100%, rễ bám giá thể tốt và bắt đầu sinh trưởng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Đức Thành (2000), *Nuôi cấy mô tế bào thực vật – nghiên cứu và ứng dụng*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
2. Trần Văn Minh, Nguyễn Văn Uyển (2001), “Vi nhân giống phong lan nhóm *Dendrobium* trên quy mô công nghiệp”, *Tạp chí Khoa học Công nghệ*, 1:1-9.
3. Nguyễn Văn Song (2011), “Nhân nhanh vi tro lan Kim Điệp (*Dendrobium chrysotoxum*) – một loài lan rừng có nguy cơ tuyệt chủng”, *Tạp chí khoa học Đại học Huế*, 64:127-136.
4. Nguyễn Thị Sơn, Nguyễn Thị Lý Anh, Vũ Ngọc Lan, Trần Thế Mai (2011), “Nhân giống in vitro loài Lan *Dendrobium fimbriatum* Hook”, *Tạp chí Khoa học và phát triển 2012*, Tập 10 (2): 263-271.
5. Nguyễn Thiện Tịch (1996), *Kỹ thuật nuôi trồng hoa lan*, Nhà xuất bản Nông nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh.

IN VITRO PROPAGATION OF THE *Dendrobium Anosmum*

Nguyen Quynh Trang, Vu Thi Hue, Khuat Thi Hai Ninh, Nguyen Thi Tho

SUMMARY

We are successfully in creating a procedure for producing the plantlets of *Dendrobium anosmum* from using *in vitro* tissue culture. The *Dendrobium anosmum* seeds were sterilized in HgCl₂ 0,1% and NaOCl 5% in 7 minutes and 15 minutes, we achieve the highest rate of regeneration sample and clean sample. The Knuds medium supplement 0,3mg/INAA + 0,3mg/l Kinetin +3mg/l BAP make the shoots multiply faster reaching to 5,8 times after 3 weeks of culture with good quality. After 4 weeks, the Knuds medium supplement 30g/l sucrose + 0,5mg/l GA₃ + 0,1mg/l Kinetin give the fastest growing shoot (2,45 cm) in good quality. The Knuds medium supplement 0,5mg/l IBA and 0,3mg/l IBA + 0,1mg/l NAA, the rate of rooted shoots was 98%, average of 3 roots for shoot. Shoots which had more than 4cm height and 3-4 roots can be trained outside in nature 1 week and then will be washed agar and be transplanted into suitable bases.

Keywords: *Dendrobium anosmum*, *in vitro*, Knuds, propogation, procedure

Người phản biện: TS. Hà Văn Huân

Ngày nhận bài: 06/5/2013

Ngày phản biện: 19/8/2013

Ngày quyết định đăng: 20/9/2013