

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY *IN VITRO* TRONG NHÂN GIỐNG LAN HOÀNG THẢO KÈN (*Dendrobium lituiflorum* Lindley)

Nguyễn Văn Việt

Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Vi nhân giống lan Hoàng thảo kèn (*Dendrobium lituiflorum* Lindley) bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* đã được nghiên cứu thành công. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sát khuẩn bề mặt quả lan bằng ethanol 70% trong 1 phút, khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 12 phút và nuôi cấy trên môi trường Knops, cho tỷ lệ mẫu sạch là 86,7%, tỷ lệ mẫu phát sinh thể chồi (protocorm) là 76,7% với thời gian phát sinh chồi 5 tuần. Cầm ứng tạo đa chồi trên môi trường BAP 0,8 mg/l, Kinetin 0,3 mg/l, NAA 0,1 mg/l, dịch chiết khoai tây 100 ml/l, nước dừa 100 ml/l, sucrose 30 g/l, agar 5 g/l cho hệ số nhân chồi cao nhất 10,3 sau 5 tuần nuôi cấy. Chồi ra rễ 100%, số rễ trung bình 4,8 rễ/cây và chiều dài rễ trung bình 3,6 cm khi nuôi trên môi trường Knops bổ sung IBA 0,2 mg/l, NAA 0,3 mg/l, dịch chiết khoai tây 100 ml/l, sucrose 20 g/l sau 5 tuần nuôi cấy. Cây con hoàn chỉnh được huấn luyện và chuyển ra trồng trên giá thể đốn trắng, xử lý giá thể 2 ngày trong nước, cho tỉ lệ cây sống 89%.

Từ khóa: Cụm chồi, *Dendrobium lituiflorum*, Lan Hoàng thảo kèn, nuôi cấy mô, vi nhân giống.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan Hoàng thảo kèn (*Dendrobium lituiflorum* Lindley) là thực vật bản địa của khu vực Đông Nam Á, tại Việt Nam chúng được phân bố ở Sơn La, Điện Biên, Lai Châu, lan Hoàng thảo kèn có hoa mang sắc tím quỳn rữ, biến thiên từ nhạt đến đậm, môi hình chiếc kèn, lan Hoàng thảo kèn rất dễ trồng nhưng còn phụ thuộc vào thời tiết vùng miền, lan Hoàng thảo kèn là một trong những loài hoa đẹp và quý hiếm. Hiện nay, ngoài tự nhiên còn rất ít, hiếm gặp vì bị săn lùng quá nhiều do vẻ đẹp của chúng. Ở một số nơi trên thế giới, Hoàng thảo kèn còn được đưa vào diện cần được bảo tồn nghiêm ngặt. Tại Việt Nam, lan Hoàng thảo kèn được đưa vào sách đỏ với mức độ đe dọa R. Vì vậy, loài này cần có chiến lược bảo tồn và phát triển nguồn gen nhằm giảm áp lực săn lùng loài cây này ngoài tự nhiên. Một trong những biện pháp hữu hiệu để bảo tồn và phát triển loài lan quý hiếm này cần phải tiến hành nhân giống bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*.

Kỹ thuật nhân giống *in vitro* là phương pháp hiệu quả nhất hiện nay với các ưu điểm như tạo được cây con trẻ hoá và sạch bệnh nên tiềm năng sinh trưởng, phát triển và năng suất

cao, khắc phục được nhược điểm của phương pháp nhân giống truyền thống, khôi phục lại các phẩm chất vốn có của thực vật. Đồng thời hệ số nhân của phương pháp nhân giống này cao đáp ứng được nhu cầu về số lượng và chất lượng cây giống, đáp ứng nhu cầu sản xuất trên quy mô rộng (Vũ Ngọc Lan, 2013).

Trên thế giới và ở Việt Nam nhiều nghiên cứu về nhân giống *in vitro* cây *Dendrobium* đã được thực hiện (Jaime A, 2015; Lita Soetopo, 2012; Sana Asghar, 2011; Nguyễn Văn Kết, 2010; Vũ Kim Dung, 2016) nhưng các nghiên cứu về nhân giống lan Hoàng thảo kèn còn rất hạn chế.

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

II. VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nuôi cấy là quả lan Hoàng thảo kèn (*Dendrobium lituiflorum* Lindley) thu thập tại Lai Châu, được lưu giữ tại vườn ươm Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp – Trường Đại học Lâm nghiệp.

Hóa chất dùng để khử trùng mẫu là HgCl₂ 0,1%.

Các loại môi trường nuôi cấy được ghi ở bảng 1.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nuôi cấy khởi động: Mẫu quả lan Hoàng thảo kèn rửa sạch bằng nước máy, ngâm mẫu trong dung dịch xà phòng loãng 5 - 10 phút, rửa lại dưới vòi nước máy 2 - 3 lần, tráng lại bằng nước cất vô trùng 2 - 3 lần, Sát khuẩn bề mặt bằng ethanol 70% trong 1 phút, tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 - 4 lần. Khử trùng mẫu bằng HgCl₂ 0,1% trong các khoảng thời gian khác nhau, rửa lại mẫu bằng nước cất vô trùng sau mỗi lần khử trùng. Tách vỏ quả, trái hạt lên môi trường nuôi cấy khởi động (MTKĐ). Sau 4 - 5 tuần hạt bắt đầu tái sinh thể chồi (protocorm) - là nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo.

Nhân nhanh thể chồi: Mẫu hạt lan Hoàng thảo kèn được nuôi cấy trên môi trường tạo thể chồi (TC₁₋₈) gồm môi trường chất khoáng cơ bản Knops bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng (ĐHST) có nồng độ khác nhau, dưới ánh sáng giàn đèn Neon. Sau 5 tuần nuôi cấy, mẫu tạo thể chồi, thống kê số thể chồi trong bình và tính hệ số nhân.

Nhân nhanh chồi: Các chồi hữu hiệu được nuôi cấy trên môi trường nhân nhanh chồi (NC₁₋₈), Nuôi cấy bằng môi trường chất khoáng cơ bản Knops bổ sung các chất ĐHST với nồng độ khác nhau. Kết quả thí nghiệm

được theo dõi trong 5 tuần, thống kê hệ số nhân chồi và đặc điểm của cụm chồi.

Tạo cây hoàn chỉnh: Chọn cụm chồi phát triển đồng đều, dùng kéo hoặc dao sắc tách các chồi hữu hiệu và cấy lên môi trường cảm ứng ra rễ (RK₁₋₈) để bình nuôi dưới ánh sáng giàn đèn Neon, sau 5 tuần chồi ra rễ tạo cây con hoàn chỉnh, thống kê số rễ trên chồi, đo chiều dài rễ và đánh giá chỉ số ra rễ.

Huấn luyện và ra ngôi: Các cây con lan Hoàng thảo kèn *in vitro* trong bình từ thí nghiệm trên được huấn luyện trong nhà lưới 1 tuần. Sau đó lấy cây ra khỏi bình và rửa sạch môi trường dưới vòi nước chảy và cấy vào các khay đã chuẩn bị giá thể có thành phần khác nhau. Đặt các khay cây trong nhà lưới, nếu trời nắng cần che 70% ánh sáng bằng lưới đen, tưới nước 2 - 3 lần/ngày. Thống kê tỷ lệ cây sống/chết và đánh giá chất lượng cây sau 6 tuần.

Các thí nghiệm được bố trí trong các bình thủy tinh hình trụ (5 - 7 mẫu/bình), mỗi công thức thí nghiệm lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel.

Điều kiện nuôi cấy: Cường độ chiếu sáng 2000 Lux; thời gian chiếu sáng: 14 giờ/ngày; nhiệt độ phòng nuôi: 24 ± 2⁰C.

Các loại môi trường nuôi cấy trong nghiên cứu dựa trên môi trường dinh dưỡng cơ bản Knops. Các môi trường nuôi cấy được chuẩn độ pH = 5,8; khử trùng ở 118⁰C, áp suất 1atm trong 17 phút.

Bảng 1. Thành phần các loại môi trường nuôi cấy lan Hoàng thảo kèn

Giai đoạn nuôi cấy	Ký hiệu môi trường	Thành phần môi trường nuôi cấy
Nuôi cấy khởi động	MTKĐ	Knops bổ sung sucrose 30 g/l, agar 7 g/l.
Môi trường nhân thể chồi	TC ₁₋₈	Knops bổ sung BAP 0,2 - 1,0 mg/l, Kinetin 0,3 - 0,4 mg/l, NAA 0,1 - 0,2 mg/l, nước dừa 100 ml/l, dịch chiết khoai tây 100 ml/l, sucrose 30 g/l, agar 5 g/l.
Nhân nhanh chồi	NC ₁₋₈	Knops bổ sung BAP 0,2 - 1,6 mg/l, Kinetin 0,2 - 0,3 mg/l, NAA 0,1 - 0,2 mg/l, nước dừa 100 ml/l, dịch chiết khoai tây 100 ml/l, sucrose 30 g/l, agar 5 g/l.
Ra rễ tạo cây hoàn chỉnh Huấn luyện và ra ngôi	RK ₁₋₈	Knops bổ sung IBA 0,1- 0,3 mg/l, NAA 0,1 - 0,3 mg/l, sucrose 20 g/l, dịch chiết khoai tây 100 ml/l, agar 5 g/l. Các loại giá thể (dón trắng, vỏ thông, xơ dừa) thời gian ngâm các loại giá thể (2 - 6 ngày).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo mẫu sạch và tái sinh thể chồi in vitro

Mẫu quả lan Hoàng thảo kèn sau khi được làm sạch được khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% với 4 công thức khác nhau về thời gian. Sau 5 tuần nuôi cấy trên môi

trường nuôi cấy khởi động, kết quả cho thấy (bảng 2) khi sử dụng dung dịch HgCl₂ 0,1% để khử trùng mẫu với thời gian khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tạo mẫu sạch và khả năng nảy mầm của phôi hạt lan Hoàng thảo kèn.

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến tỷ lệ mẫu sạch và tạo thể chồi

CTMT	Thời gian khử trùng (phút)		Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu tạo thể chồi (%)
	Lần 1	Lần 2		
ĐC	0	0	13,3	13,3
CT1	5	5	43,3	33,3
CT2	6	5	70,0	56,7
CT3	7	5	86,7	76,7
CT4	8	5	93,3	63,3

Trong đó, công thức CT₁ cho tỷ lệ mẫu sạch (43,3%), tỷ lệ mẫu sạch nảy mầm (33,3%) thấp nhất; công thức CT₃ cho tỷ lệ mẫu sạch (86,7%) và tỷ lệ mẫu sạch nảy mầm (76,7%); công thức CT₄ cho tỷ lệ mẫu sạch cao nhất (93,3%) nhưng tỷ lệ mẫu sạch nảy mầm lại thấp (63,3%). Điều này cũng tương đối phù hợp bởi HgCl₂ 0,1% là chất rất độc, nếu khử trùng lâu hóa chất sẽ ngấm vào mô thực vật sẽ làm hỏng hoặc gây độc do đó protocorm không thể phát sinh (Jaime A, et al, 2015). Do vậy, công thức khử trùng phù hợp là CT₃, với thời gian khử trùng 12 phút (lần 1: 7 phút; lần 2: 5 phút), cho tỷ lệ mẫu sạch và phát sinh protocorm là 86,7%, tỷ lệ mẫu nảy chồi 76,7% (hình 1a). Kết quả

phân tích phương sai một nhân tố cũng cho thấy $F_{tính} = 39,85 > F_{0,05} = 3,48$ chứng tỏ khi sử dụng HgCl₂ 0,1% để khử trùng mẫu với thời gian khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tạo mẫu sạch lan Hoàng thảo kèn.

3.2. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến khả năng nhân nhanh thể chồi

Thể chồi tái sinh từ hạt lan trong môi trường nuôi cấy khởi động được cấy chuyển sang môi trường nhân nhanh thể chồi. Thí nghiệm được bố trí gồm 8 công thức có sử dụng các chất điều hòa sinh trưởng thực vật với nồng độ khác nhau và 1 công thức đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật (bảng 3). Sau 5 tuần theo dõi và thu thập số liệu về hệ số tạo thể chồi, đặc điểm thể chồi.

Bảng 3. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến khả năng nhân nhanh thể chồi

CTTN	Chất ĐHST (mg/l)			Hệ số nhân thể chồi (lần)	Đặc điểm thể chồi
	BAP	Kinetin	NAA		
ĐC	-	-	-	4,1	+
TC ₁	0,2	0,4	0,1	8,3	+
TC ₂	0,5	0,4	0,1	10,5	++
TC ₃	0,7	0,4	0,1	10,2	++
TC ₄	1,0	0,4	0,1	9,9	++
TC ₅	0,2	0,3	0,2	8,8	+
TC ₆	0,5	0,3	0,2	13,6	+++
TC ₇	0,7	0,3	0,2	10,7	+++
TC ₈	1,0	0,3	0,2	9,9	++

Ghi chú: (+): chồi nhỏ, ngắn, màu xanh nhạt; (++) : chồi trung bình, kích thước không đồng đều; (+++): chồi mập, màu xanh đậm, đồng đều.

Kết quả bảng 3 cho thấy, nuôi cấy thể chồi trên môi trường Knops có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến quá trình tạo thể chồi *in vitro*. Ở công thức đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật, hệ số nhân thể chồi thấp (4,1 lần), chất lượng thể chồi kém, kích thước nhỏ. Đặc biệt công thức TC₇ đã cho hệ số tạo thể chồi cao nhất đạt 10,7 lần và thể chồi nhiều, mập, màu xanh. Hệ số tạo thể chồi lan Hoàng thảo kèn trên môi trường Knops bổ sung BAP 0,7 mg/l, Kinetin 0,3 mg/l, NAA 0,2 mg/l cao hơn so với báo cáo của Nguyễn Thị Sơn và cộng sự (2012) khi nhân nhanh thể chồi *Dendrobium fimbriatum* Hook trong 8 tuần chỉ đạt 4,63 lần (Nguyễn Thị Sơn và cộng sự, 2011). Kết quả phân tích phương sai một nhân tố cũng cho thấy $F_{tính} = 20,11 > F_{0,05} = 2,51$. Điều đó chứng tỏ hàm lượng các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng nhân nhanh thể chồi lan Hoàng thảo kèn.

3.3. Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa

Bảng 4. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến khả năng nhân nhanh chồi

CTTN	Chất ĐHST (mg/l)			Khả năng nhân nhanh chồi		
	BAP	Kinetin	NAA	Số chồi TB/mẫu	Chiều cao TB chồi (cm)	Số lá TB/chồi
ĐC	-	-	-	3,7	2,4	2,8
NC ₁	0,2	0,3	0,1	6,3	2,7	3,2
NC ₂	0,4	0,3	0,1	7,3	2,9	3,3
NC ₃	0,6	0,3	0,1	7,3	3,1	3,6
NC ₄	0,8	0,3	0,1	10,3	3,2	4,1
NC ₅	1,0	0,2	0,2	8,7	3,0	3,7
NC ₆	1,2	0,2	0,2	6,7	2,9	3,6
NC ₇	1,4	0,2	0,2	6,3	3,1	3,8
NC ₈	1,6	0,2	0,2	5,7	2,8	3,6

Ở công thức NC₁₋₄ nồng độ BAP tăng (0,2 - 0,8 mg/l), Kinetin 0,3mg/l và NAA 0,1 mg/l dẫn đến số chồi TB/mẫu tăng 6,3 – 10,3 trong khi tăng nồng độ chất ĐHST thì số chồi

sinh trưởng thực vật đến khả năng nhân nhanh chồi

Nhanh chồi là công đoạn có ý nghĩa hết sức quan trọng đối với việc tạo ra số lượng lớn cây con *in vitro*. Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật Kinetin, BAP và NAA thường được bổ sung kết hợp để làm cho hệ số nhân của chồi tăng lên rõ rệt (Huidrom S, Devi et al, 2013). Trong các thí nghiệm này, sử dụng các chất điều hòa sinh trưởng thực vật có nồng độ khác nhau để kích thích tạo nhiều chồi nhằm đáp ứng các yêu cầu tạo ra hệ số nhân cao, chồi sinh trưởng, phát triển tốt. Các thể chồi lan được tạo ra từ thí nghiệm trên được cấy vào môi trường nhân nhanh để tạo cụm chồi.

Kết quả bảng 4 cho thấy, khi sử dụng công thức môi trường nuôi cấy khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng nhân nhanh chồi lan Hoàng thảo kèn. Số chồi TB/mẫu cấy ban đầu đạt 3,7 – 10,3 lần, chiều cao trung bình của chồi đạt 2,4 – 3,2 cm và số lá trung bình của một chồi đạt 2,8 – 4,1.

TB/mẫu lại giảm xuống. Kết quả nghiên cứu cho thấy, công thức môi trường NC₄ (môi trường khoáng cơ bản Knops bổ sung BAP 0,8 mg/l và Kinetin 0,3 mg/l, NAA 0,1 mg/l) cho

kết quả tốt nhất, với giá trị trung bình: số chồi đạt 10,3 chồi/mẫu cây ban đầu, chiều cao đạt 3,2 cm và số lá 4,1 (hình 1c). Kết quả phân tích phương sai một nhân tố cho thấy $F_{tính} = 40,46 > F_{0,05} = 2,51$, như vậy nồng độ chất ĐHST khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến số chồi trung bình/mẫu.

3.4. Kích thích ra rễ tạo cây hoàn chỉnh

Tạo cây con hoàn chỉnh là giai đoạn cuối cùng của quá trình nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào. Môi trường nuôi cấy có bổ sung chất ĐHST thực vật với các nồng độ khác nhau cho kết quả thu được ở bảng 5. Kết quả thí nghiệm cho thấy, ở công thức đối chứng chỉ đạt tỷ lệ chồi ra rễ 46,7% và số rễ trung bình 1,7 và chiều dài trung bình rễ đạt 1,8 cm, chỉ số ra rễ 3,1 với chất lượng rễ ngắn, xấu. Các công thức RK_{1-2} có nồng độ NAA 0,1 - 0,3 mg/l tỷ lệ chồi ra rễ thấp 66,7 - 89,3%,

tương tự ở công thức RK_{3-4} có nồng độ IBA 0,1 - 0,3 mg/l tỷ lệ chồi ra rễ cũng chỉ đạt 73,3 - 83,3%. Trong khi phối hợp nồng độ của NAA và IBA như ở các công thức R_{5-8} thì tỷ lệ ra rễ đạt 60 - 100%. Do đó lựa chọn công thức RK_5 với thành phần là môi trường khoáng cơ bản Knops bổ sung NAA 0,3 mg/l, IBA 0,1 mg/l cho tỷ lệ chồi ra rễ cao nhất đạt 100%, số rễ TB/cây 4,8 và chiều dài TB/rễ đạt 3,6 cm, chỉ số ra rễ 17,3 (hình 1e). Kết quả đạt được cũng tương tự như của tác giả Vũ Kim Dung và cộng sự (2016) đã dùng môi trường khoáng MS bổ sung NAA 0,3 mg/l, IBA 0,2 mg/l nghiên cứu ra rễ đối với lan Hoàng thảo ý thảo ba màu, tỷ lệ ra rễ đạt 93,33%. Kết quả phân tích phương sai một nhân tố cũng cho thấy $F_{tính} = 84,45 > F_{0,05} = 2,51$, nghĩa là hàm lượng các chất ĐHST khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến số rễ TB/cây.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ NAA và IBA đến khả năng ra rễ

CTTN	Chất ĐHST (mg/l)		Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ TB/cây	Chiều dài TB/rễ (cm)	Chỉ số ra rễ
	NAA	IBA				
ĐC	-	-	46,7	1,7	1,8	3,1
RK_1	0,1	-	66,7	2,9	2,1	6,1
RK_2	0,3	-	89,3	4,7	2,5	11,8
RK_3	-	0,1	73,3	4,1	2,9	11,9
RK_4	-	0,3	83,3	4,3	3,3	14,2
RK_5	0,3	0,1	100	4,8	3,6	17,3
RK_6	0,1	0,3	76,7	3,7	3,8	14,1
RK_7	0,2	0,1	86,7	3,7	3,7	13,7
RK_8	0,1	0,2	60,0	3,3	3,0	9,9

3.4. Huấn luyện và đưa cây ra ngoài trồng

Các bình cây con đủ tiêu chuẩn chiều cao $\geq 2,5$ cm, có 2 - 4 rễ và 3 - 4 lá được huấn luyện cây trong thời gian 1 tuần ở nhà lưới có mái che (cần che thêm bằng lưới đen để tránh ánh sáng trực xạ). Sau đó lấy cây ra khỏi bình, rửa sạch môi trường nuôi cấy dưới vòi nước máy,

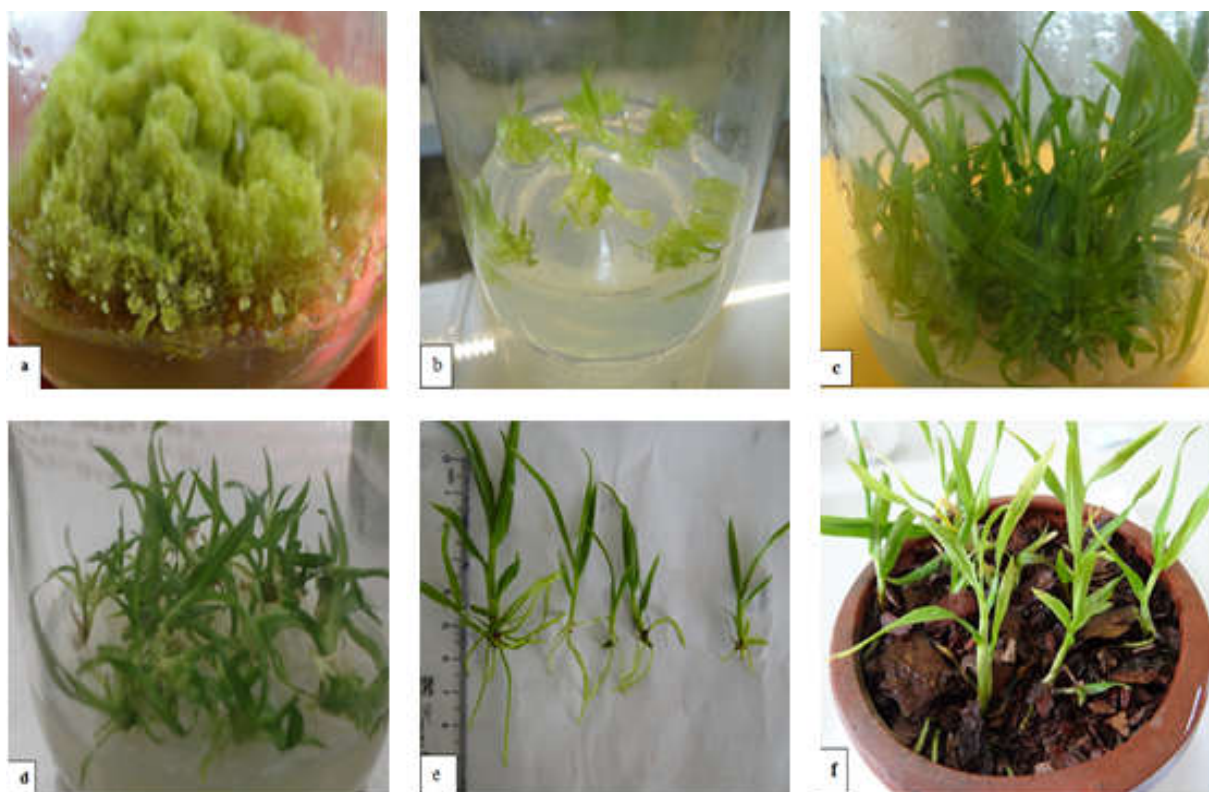
tiếp tục trồng cây vào khay với các giá thể khác nhau. Thí nghiệm được bố trí với 9 công thức, gồm 3 loại giá thể (xơ dừa, dớn trắng, vỏ thông) được xử lý bằng cách ngâm trong nước với thời gian khác nhau, tưới nước 3 lần/ngày đảm bảo vừa đủ độ ẩm, chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ sống (%) trong 6 tuần.

Bảng 6. Ảnh hưởng của loại giá thể và thời gian xử lý đến tỷ lệ sống

Loại giá thể	Thời gian xử lý giá thể (ngày)	Tỷ lệ sống (%)	Chất lượng cây
Xơ dừa	2	27,7	Kém
	4	34,3	Kém
	6	57,7	Trung bình
Dớn trắng	2	89,0	Tốt
	4	81,3	Tốt
	6	71,0	Trung bình
Vỏ thông	2	41,0	Kém
	4	44,3	Kém
	6	77,7	Trung bình

Kết quả thí nghiệm cho thấy (bảng 6), khi dùng dớn trắng đã được xử lý 2 ngày trong nước làm giá thể trồng lan Hoàng thảo kèn cho tỷ lệ sống cao nhất đạt tới 93,33% sau 6 tuần theo dõi. Vào thời điểm này lan Hoàng thảo kèn đã bắt đầu hình thành lá mới và rễ

vẫn tiếp tục được kéo dài (hình 1f). Như vậy, với thời gian xử lý 2 ngày giá thể dớn đủ mềm có khả năng giữ nước tốt, đủ độ xốp, giúp rễ cây giữ ẩm tốt, phù hợp với việc nuôi trồng lan Hoàng thảo kèn.



Hình 1. Ảnh cây ở các giai đoạn trong quy trình nhân giống lan Hoàng thảo kèn

Ghi chú: a) Tạo protocorm; b) Nhân chồi trên môi trường Knops; c) Cụm chồi nuôi cây trên môi trường NC₄; d) Nhân nhanh chồi trên môi trường NC₁; e) Rễ Hoàng thảo kèn; f) Trồng lan vào giá thể

IV. KẾT LUẬN

Mẫu quả lan Hoàng thảo kèn được khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 12 phút và được chia ra làm 2 lần khử trùng (lần 1: 7 phút; lần 2: 5 phút). Nhân nhanh thể chồi bằng môi trường khoáng cơ bản Knops bổ sung 0,8 mg/l BAP, 0,3 mg/l kinetin, 0,1mg/l NAA, 100 ml/l nước dừa, 100 ml/l dịch chiết khoai tây, 30g/l sucrose, 5g/l agar. Cảm ứng tạo đa chồi là môi trường khoáng cơ bản Knops bổ sung BAP 0,8 mg/l và Kinetin 0,3 mg/l, NAA 0,1 mg/l, 100 ml/l nước dừa, 100 ml/l dịch chiết khoai tây, 30g/l sucrose, 5g/l agar. Kích thích ra rễ tạo cây hoàn chỉnh bằng môi trường khoáng cơ bản Knops bổ sung 0,3 mg/l NAA, 0,1 mg/l IBA, 100 ml/l nước dừa, 100ml/l dịch chiết khoai tây, 20g/l sucrose, 5g/l agar. Huấn luyện cây trong bình 1 tuần ở điều kiện nhà lưới, trồng bằng giá thể dớn trắng đã được xử lý 2 ngày trước khi trồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vũ Kim Dung, Nguyễn Văn Việt, Bùi Văn Thắng (2016). Nhân giống lan Hoàng thảo ý thảo ba mẫu (*Dendrobium gratiosissimum* Reichenb.f) bằng kỹ thuật

nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp* số 6-2016, tr. 156-161.

2. Nguyễn Văn Kết, Nguyễn Văn Vinh (2010). Nghiên cứu khả năng nhân giống loài Lan Hoàng Thảo Sáp (*Dendrobium crepidatum* Lindl, & Paxt.) *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 48 (5), tr. 89 – 95.

3. 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), tr. 917 – 925.

4. Nguyễn Thị Sơn, Nguyễn Thị Lý Anh, Vũ Ngọc Lan et al. (2011). Nhân giống *in vitro* loài lan *Dendrobium fimbriatum* Hook (Hoàng thảo long nhãn). *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 10 (2): 263 – 271.

5. Huidrom S, Devi, Sanglakpam I et al. (2013). High frequency plant regeneration system of *Aerides odorata* Lour, through foliar and shoot tip culture. *Not Bot Horti Agrobo*, 41(1):169 – 176.

6. Jaime A, Teixeira da Silva, Jean Carlos Cardoso et al. (2015). *Dendrobium* micropropagation a review. *Plant Cell Rep*, 34, pp. 671- 704.

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

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

USING *IN VITRO* CULTURE TECHNIQUE FOR PROPAGATION OF *DENDROBIUM LITUIFLORUM* LINDLEY

Nguyen Van Viet

Vietnam National University of Forestry

SUMMARY

Micropropagation of *Dendrobium lituiflorum* Lindley by *in vitro* cultural technique has been successfully studied. The results showed that the optimal method for bud sterilization was soaked in ethanol 70% for 1 minute, by HgCl₂ 0.1% solution for 12 minutes and then culturing the sample with Knops medium as the proportion of reached survival rate was 86.7% and protocorm rate was 76.7% after 5 weeks. Forming multi-buds induction in Knops with 6-benzylaminopurine (BAP) 0.8 mg/l, Kinetin 0.3 mg/l, α -naphthaleneacetic acid (NAA) 0.1 mg/l, coconut water 100 ml/l, potatoes extract 100 ml/l, sucrose 30g/l, agar 5 g/l the coefficient of formed buds was highest at 10.3% after 5 weeks. The rooting shoots rate was 100%, the average number of roots was 4.8 per individual and the average length of roots was 3.6 cm when cultured in Knops medium supplemented with IBA 0.2 mg/l, NAA 0.3 mg/l, and potatoes extract 100 ml/l, sucrose 20g/l after 5 weeks. The completed nurslings were trained and planted on the sphagnum moss and immersed in 2 days. They got the rate of living at 89%.

Keywords: *Dendrobium lituiflorum* Lindley, *in vitro*, Knops, propagation, protocorm, rooting.

Ngày nhận bài : 20/7/2017

Ngày phản biện : 25/7/2017

Ngày quyết định đăng : 07/8/2017