

**NHÂN GIỐNG LAN HOÀNG THẢO Ý THẢO BA MÀU
(*DENDROBIUM GRATIOSISSIMUM* REICHENB.F.)
BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CÂY *IN VITRO***

Vũ Kim Dung¹, Nguyễn Văn Việt², Bùi Văn Thắng³

^{1,2,3}Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Lan Hoàng thảo Ý thảo ba màu là cây cảnh có hoa đẹp nhưng đang bị suy kiệt và khan hiếm trong tự nhiên. Kỹ thuật nhân giống *in vitro* cây Lan Hoàng thảo Ý thảo ba màu đã được nghiên cứu thành công góp phần vào công tác bảo tồn giống và nhân nhanh cây con phục vụ thương mại hóa loài lan có giá trị thẩm mỹ cao này. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sát khuẩn bề mặt quả lan bằng ethanol 70% trong 2 phút, khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 10 phút và nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung sucrose 30 g/l, cho tỷ lệ mẫu sạch là 96,67%, tỷ lệ mẫu phát sinh protocorm 90% với thời gian phát sinh chồi 20 ngày. Cầm ứng tạo đa chồi trên môi trường BAP 0,5 mg/l, NAA 0,3 mg/l, Kinetin 0,3 mg/l, dịch chiết khoai tây 100 ml/l, nước dừa 100 ml/l, sucrose 30 g/l, cho hệ số nhân chồi và tỷ lệ mẫu tái sinh chồi cao nhất (9,53 và 96,67%) sau 4 tuần nuôi cấy. Chồi ra rễ 93,33% và chiều dài rễ trung bình 3,22 cm khi nuôi trên môi trường MS 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.

Từ khóa: Cụm chồi, *Dendrobium gratiosissimum* Reichenb.f., Hoàng thảo Ý thảo ba màu, nuôi cấy mô, vi nhân giống.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan Hoàng thảo Ý thảo ba màu (*Dendrobium gratiosissimum* Reichenb.f.) là cây cảnh có hoa đẹp, hương thơm ngát, dáng hoa buông thõng như thác nước nên được giới chơi hoa rất ưa chuộng. Trên thế giới, Lan Hoàng thảo Ý thảo ba màu phân bố tại Hải Nam (Trung Quốc), Assam (Ấn Độ), Lào, Thái Lan, Việt Nam và Myanma tại cao độ trong khoảng 1600 mét. Ở Việt Nam, Lan Hoàng thảo Ý thảo sống trong tự nhiên phân bố ở các tỉnh Quảng Trị, Kon Tum, Gia Lai, Lâm Đồng (Nông Văn Duy và cs, 2011).

Tuy nhiên do trên thị trường hoa lan hiện nay, Lan Hoàng thảo Ý thảo ba màu rất được ưa chuộng và săn tìm, đặc biệt là lan sống ngoài tự nhiên dẫn đến tình trạng suy kiệt và khan hiếm. Bên cạnh đó, do điều kiện tự nhiên bất lợi và nạn khai thác quá mức dẫn đến nguy cơ làm mất nguồn gen loài lan rừng này trong một tương lai gần. Vì vậy, để bảo tồn và phát triển loài lan quý hiếm này cần phải tiến hành nhân giống bằng kỹ thuật nhân giống *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 non trẻ 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 và cs, 2013).

Trên thế giới và ở Việt Nam nhiều nghiên cứu về nhân giống *in vitro* cây *Dendrobium* đã được thực hiện (Jaime A. et al., 2015; Lita Soetopo et al., 2012; Sana Asghar et al., 2011; Nguyễn Văn Kết và cs, 2010; Vũ Ngọc Lan và cs, 2013) nhưng các nghiên cứu về nhân giống Lan Hoàng thảo Ý thảo ba màu còn rất hạn chế.

Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu nhân giống *in vitro* Lan Hoàng thảo Ý thảo ba màu đạt hiệu quả cao nhằm góp phần vào công tác bảo tồn giống và nhân nhanh cây con 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 hạt từ quả của những cây lan rừng thuộc loài *Dendrobium gratiosissimum* Reichenb.f. thu thập tại Lâm Đồng, được trồng tại Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp – Trường Đại học Lâm nghiệp.

Hóa chất dùng để khử trùng mẫu là ethanol 70% và HgCl₂ 0,1%.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tạo mẫu sạch: Mẫu quả lan được rửa sạch bằng nước máy, ngâm mẫu trong dung dịch xà phòng loãng khoảng 5 - 10 phút và rửa kỹ dưới vòi nước chảy. Sát khuẩn bề mặt bằng ethanol 70% trong 2 phút. Khử trùng mẫu bằng HgCl₂ 0,1%, với các thời gian khác nhau. Sau mỗi lần dùng hóa chất để khử trùng đều phải tráng rửa mẫu bằng nước cất vô trùng.

Nuôi cấy khởi động: Quả lan sau khi khử trùng được cắt dọc quả bằng dao, tách lấy hạt và cấy lên môi trường nuôi cấy khởi động (MTKĐ), bao gồm môi trường khoáng cơ bản MS (Murashige T. and Skoog F.) bổ sung sucrose 30 g/l, agar 5 g/l, trong 4 tuần để khảo sát tỷ lệ mẫu sạch và khả năng nảy mầm của hạt.

Nhanh chồi: Thê chồi (protocorm) tái sinh từ hạt được cấy lên môi trường nhân nhanh chồi với thành phần là môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung BAP (0,3 - 0,5 mg/l), NAA (0,2 - 0,3 mg/l), Kinetin (0,1 - 0,5 mg/l), dịch chiết khoai tây 100 ml/l, nước dừa 100 ml/l, sucrose 30 g/l và agar 5 g/l, sau 4 tuần nuôi cấy, mẫu tạo cụm chồi, thống kê số chồi trên cụm chồi, số chồi hữu hiệu (chiều cao \geq 2 cm) và tính hệ số nhân chồi.

Tạo cây hoàn chỉnh: Các chồi hữu hiệu có chiều cao \geq 3 cm, phát triển đồng đều, dùng kéo hoặc dao sắc tách và cấy lên môi trường kích thích ra rễ tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh với thành phần môi trường bao gồm môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung NAA (0,2 - 0,4

mg/l), IBA (0,2 - 0,4 mg/l), dịch chiết khoai tây 100 ml/l, nước dừa 100 ml/l, sucrose 20 g/l và agar 5 g/l. Các bình chồi được nuôi 4 - 5 tuần, chồi ra rễ tạo cây con hoàn chỉnh, thống kê số rễ trên chồi và đo chiều dài rễ.

Tất cả các môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH = 5,8 và khử trùng ở nhiệt độ 121^oC trong 15 phút, mẫu sau khi cấy được nuôi dưới ánh sáng gián đèn neon, thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 3000 lux, nhiệt độ phòng nuôi 25 \pm 2^oC.

Các thí nghiệm được bố trí trong các bình thủy tinh hình trụ (3 mẫu/bình), mỗi công thức thí nghiệm cấy 30 mẫu, lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU, THẢO LUẬN

3.1. Tạo mẫu sạch *in vitro*

Mẫu quả Lan Hoàng thảo Ý thảo ba màu sau khi làm sạch được khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% với 7 công thức khác nhau về thời gian. Sau 4 tuần nuôi cấy trên MTKĐ, kết quả cho thấy (bảng 1) tỷ lệ tạo mẫu sạch và protocorm đạt trên 60%. Bằng phương pháp khử trùng kép này thì thời gian khử trùng càng dài tỷ lệ mẫu sạch càng cao, tỷ lệ mẫu sạch đạt 66,67 - 99,67%, tỷ lệ mẫu tạo protocorm đạt 60 - 90% và thời gian mẫu phát sinh chồi ngắn (20 ngày). Tuy nhiên, thời gian khử trùng quá dài (15 phút) thì tỷ lệ mẫu phát sinh protocorm giảm (66,67 - 73,33%) và thời gian mẫu phát sinh chồi kéo dài (30 ngày). 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 (Lita Soetopo et al., 2012). Do vậy, công thức khử trùng phù hợp là S₄, với thời gian khử trùng 10 phút (lần 1: 7 phút; lần 2: 3 phút), cho tỷ lệ mẫu sạch 96,67%, tỷ lệ mẫu tạo protocorm đạt 90% với thời gian tái sinh 20 ngày (hình 1a).

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến tỷ lệ tạo mẫu sạch và phát sinh protocorm

CTMT	Thời gian khử trùng (phút)		Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu tạo protocorm (%)	Thời gian tái sinh (ngày)
	Lần 1	Lần 2			
S1	3	2	66,67	60,00	20
S2	4	1	76,67	66,67	20
S3	6	4	86,67	80,00	20
S4	7	3	96,67	90,00	20
S5	8	2	96,67	86,67	20
S6	10	5	99,00	73,33	30
S7	12	3	99,33	66,67	30

3.2. Nhân nhanh chồi *in vitro*

3.2.1. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng nhân nhanh chồi

Môi trường dinh dưỡng quyết định tới khả năng nhân nhanh chồi các loại cây. Với mỗi loài lan khác nhau, môi trường dinh dưỡng

dùng để nuôi cấy cũng khác nhau. Do vậy, 3 loại môi trường nền đã được sử dụng nhằm tìm ra môi trường thích hợp nhất cho sự phát triển của chồi Lan Hoàng thảo Ý thảo 3 màu. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng nhân nhanh chồi

Môi trường dinh dưỡng	Tỷ lệ mẫu tái sinh cụm chồi (%)	Hệ số nhân chồi (lần)	Đặc điểm của chồi
MS	100	5,61	Chồi mập, màu xanh lá
Knops	71,43	3,13	Chồi yếu, ít, màu xanh hơi vàng
MS*	82,86	4,02	Chồi mập, tròn đều, màu xanh lá

Sau 4 tuần nuôi cấy chồi lan trên 3 môi trường nền cho thấy có sự khác nhau rõ rệt về tỷ lệ mẫu tái sinh chồi và chất lượng chồi (bảng 2). Kết quả khác biệt này là do giữa 3 loại môi trường có hàm lượng cacbon, khoáng đa lượng, vi lượng, vitamin khác nhau. Các thành phần chất dinh dưỡng sẽ ảnh hưởng trực tiếp tới các quá trình sinh lý, sinh hóa của thực vật, từ đó cụm chồi phát triển sẽ khác biệt. Trên 3 môi trường nền, môi trường cơ bản MS thích hợp cho tái sinh chồi và chất lượng chồi tốt (hình 1b), nhiều chồi, phát triển nhanh và khỏe, màu xanh thẫm, hệ số nhân chồi đạt 5,61 lần.

3.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ chất ĐHST thực vật đến khả năng nhân nhanh chồi

Việc bổ sung Kinetin (Kin), BAP và NAA kết hợp làm cho hệ số nhân của chồi tăng lên rõ rệt. Các chất này thường được sử dụng để kích thích sự phân hóa, sinh trưởng và phát triển chồi của mẫu cấy *in vitro*. Tác dụng chủ yếu của chúng là kích thích sự phân chia mạnh mẽ của tế bào, đặc biệt ảnh hưởng rất lớn đến sự hình thành và phân hóa chồi (Nguyễn Văn Kết và cs, 2010).

Sau 4 tuần nuôi cấy, kết quả bảng 3 cho thấy khi cho đồng thời tổ hợp BAP, NAA và Kin vào trong các thí nghiệm, hệ số nhân chồi và chất lượng chồi thu được cao hơn hẳn so với chỉ bổ sung BAP và NAA (bảng 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ Kin, BAP và NAA đến khả năng nhân nhanh chồi

CT MT	Nồng độ ĐHST (mg/l)			Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi (%)	Hệ số nhân chồi (lần)	Đặc điểm chồi
	BAP	NAA	Kin			
N ₀	-	-	-	16,67	1,12	Chồi thấp, mảnh, lá vàng nhạt
N ₁	0,3	-	-	66,67	2,98	Chồi cao, mập, lá xanh đậm
N ₂	0,4	0,2	-	76,67	3,01	Chồi cao, mập, lá xanh đậm
N ₃	0,5	-	-	83,33	3,86	Chồi thấp, mảnh, lá vàng nhạt
N ₄	0,3	-	-	70,00	3,41	Chồi cao, mập, lá xanh đậm
N ₅	0,4	0,3	-	80,00	4,94	Chồi cao, mập, lá xanh đậm
N ₆	0,5	-	-	90,00	5,79	Chồi cao, mập, lá xanh đậm
N ₇	-	-	0,1	63,33	5,81	Chồi cao, mập, lá xanh đậm
N ₈	-	-	0,2	76,67	6,02	Chồi cao, mập, lá xanh đậm
N ₉	0,5	0,3	0,3	96,67	9,53	Chồi cao, mập, lá xanh đậm
N ₁₀	-	-	0,4	80,00	7,01	Chồi cao, mập, lá xanh đậm
N ₁₁	-	-	0,5	73,33	6,89	Chồi cao, mập, lá xanh đậm

Ở công thức thí nghiệm N₇ bao gồm môi trường chất khoáng cơ bản là MS bổ sung BAP 0,5 mg/l, NAA 0,3 mg/l, Kin 0,1 mg/l cho kết quả thấp với tỷ lệ số mẫu tạo cụm chồi chỉ đạt 63,33% và hệ số nhân chồi là 5,81 lần. Khi bổ sung BAP, NAA nồng độ thấp hoặc Kin nồng độ cao hơn 0,3 mg/l đều làm giảm số lượng chồi hình thành và các chồi có sự bất thường, tương tự như báo cáo của Nguyễn Văn Kết và cs, 2010; Jaime A et al., 2015. Công thức thí nghiệm N₉ bao gồm môi trường chất khoáng cơ bản MS bổ sung BAP 0,5 mg/l, NAA 0,3 mg/l, Kin 0,3 mg/l cho kết quả tốt nhất để nhân

nhân chồi Lan Hoàng thảo Ý thảo 3 màu với tỷ lệ số mẫu tạo cụm chồi 96,67% và hệ số nhân chồi đạt 9,53. Các chồi trên môi trường này cao, mập và lá xanh đậm (hình 1c).

3.3. Kích thích chồi ra rễ tạo cây hoàn chỉnh

Các chồi lan được tạo ra trên môi trường nuôi cấy nhân nhanh, chọn các chồi hữu hiệu đạt kích thước lớn hơn 3 cm, cây chuyển sang môi trường cảm ứng ra rễ có thành phần môi trường chất khoáng cơ bản MS bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật NAA và IBA với hàm lượng khác nhau (bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của tổ hợp NAA và IBA đến khả năng ra rễ

CTTN	Nồng độ ĐHST (mg/l)		Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Chiều dài rễ TB (cm)	Chất lượng rễ
	IBA	NAA			
R ₀	-	-	30,33	0,74	+
R ₁	0,2	-	43,33	1,17	+
R ₂	0,3	-	50,00	1,23	+
R ₃	0,4	-	60,00	1,54	++
R ₄	-	0,2	53,33	1,09	+
R ₅	-	0,3	63,33	1,94	++
R ₆	-	0,4	40,00	2,16	++
R ₇	0,2	0,2	80,00	2,90	+++
R ₈	0,2	0,3	93,33	3,22	+++
R ₉	0,3	0,4	83,33	2,94	+++
R ₁₀	0,4	0,5	73,67	2,20	++

Ghi chú: +: rễ sinh trưởng kém; ++: rễ sinh trưởng trung bình; +++: rễ sinh trưởng tốt

Kết quả bảng 4 cho thấy, phần lớn các công thức môi trường đều cho ra rễ tốt, trong đó tỷ

lệ chồi ra rễ cao nhất là 93,33% ở công thức môi trường R₈ có bổ sung NAA 0,3 mg/l và

IBA 0,2 mg/l, chiều dài rễ trung bình đạt 3,22 cm sau khoảng 5 tuần nuôi cấy (hình 1d).

Ở môi trường MS không bổ sung NAA và IBA, các chồi lan có tỷ lệ ra rễ thấp (30,33%) chiều dài rễ chỉ đạt 0,74 cm và màu trắng nhạt, yếu, mảnh. Khi các môi trường chỉ bổ sung IBA hoặc NAA (R₁₋₃ và R₄₋₆), tỷ lệ chồi ra rễ chỉ đạt 40 - 63% với chiều dài rễ 1,17 - 2,16 cm. Thí nghiệm bổ sung đồng thời cả IBA và NAA cho kết quả cao hơn hẳn so với chỉ bổ sung riêng rẽ IBA hay NAA. Tỷ lệ chồi ra rễ đạt 73,67 - 93,33%, chiều dài rễ 2,20 - 3,22 cm và chất lượng rễ tốt.

Như vậy, có thể chọn môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung NAA 0,3 mg/l và IBA 0,2 mg/l là môi trường thích hợp cho nuôi cấy tạo rễ Lan Hoàng thảo Ý thảo 3 màu.

IV. KẾT LUẬN

Mẫu quả Lan Hoàng thảo Ý thảo 3 màu sau

khi thu hái, rửa sạch bề mặt bằng xà phòng loãng trong 5 - 10 phút, sát khuẩn bề mặt bằng ethanol 70% trong 2 phút, khử trùng mẫu bằng HgCl₂ 0,1% trong 10 phút chia làm 2 lần (lần 1: 7 phút; lần 2: 3 phút). Nuôi cấy trên môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung sucrose 30 g/l, agar 5 g/l đạt tỷ lệ mẫu sạch 96,67%, tỷ lệ mẫu tạo protocorm đạt 90% với thời gian tái sinh 20 ngày. Nhân nhanh chồi lan trên môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung BAP 0,5 mg/l, NAA 0,3 mg/l, Kinetin 0,3 mg/l, dịch chiết khoai tây 100 ml/l, nước dừa 100 ml/l, sucrose 30 g/l và agar 5 g/l đạt tỷ lệ 96,67%, hệ số nhân chồi đạt 9,53. Tạo cây lan hoàn chỉnh trên môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung IBA 0,2 mg/l, NAA 0,3 mg/l, dịch chiết khoai tây 100 ml/l, sucrose 20 g/l, agar 5 g/l đạt tỷ lệ 93,33% chồi ra rễ và chiều dài rễ trung bình 3,22 cm.



Hình 1. Các giai đoạn trong quy trình nhân giống Lan Hoàng thảo Ý thảo 3 màu
a) Tạo protocorm; b) Cụm chồi nuôi cấy trên môi trường MS;
c) Nhân nhanh chồi trên môi trường N₉; d) Tạo rễ ở công thức môi trường R₈

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nông Văn Duy, Nguyễn Thị Thanh Hằng, Nguyễn Thị Lang (2011). Kết quả điều tra các loài lan (*Orchidaceae* Juss.) đặc hữu, quý hiếm và có giá trị kinh tế ở cao nguyên Langbian, tỉnh Lâm Đồng. Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 4, tr 515 – 519.
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.
3. Jaime A., Teixeira da Silva, Jean Carlos Cardoso, Judit Dobranszki, Songjun Zheng (2015). *Dendrobium* micropropagation: a review. *Plant Cell Rep*, 34, pp. 671- 704.
4. 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.
5. Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol plant*, 15: 473-497.
6. Sana Asghar, Touqeer Ahmad, Ishfaq Ahmad Hafiz, Mehwish Yaseen (2011). *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. *African Journal of Biotechnology*, 10 (16), pp. 3097 - 3103.

MICROPPAGATION OF *DENDROBIUM GRATIOSISSIMUM* REICHENB.F.

Vu Kim Dung¹, Nguyen Van Viet², Bui Van Thang³
^{1,2,3}Vietnam National University of Forestry

SUMMARY

Denrobium gratiosissimum Reichenb.f. are beautiful flowering plants but are depleted and scarce in nature. Micropopagation of *Denrobium gratiosissimum* by *in vitro* culture technique has been successfully studied. The results showed that the optimal method for bud sterilization was soaked in ethanol 70% for 2 minutes, in HgCl₂ 0.1% for 10 minutes and then culturing the sample with Murashige T. and Skoog F. (MS) medium provided the proportion of purified samples was 96.67% and protocorm rate was 90% after 4 weeks. Forming multi-buds induction in MS with 6-benzylaminopurine (BAP) 0.5 mg/l, Kinetin 0.3 mg/l, α -naphthaleneacetic acid (NAA) 0.3 mg/l, coconut water 100 ml/l, potatoes extract 100 ml/l, sucrose 30g/l, the coefficient of formed buds and the samples regeneration rate were highest (9.53% and 96.67%) after 4 weeks. The rooted shoots 93.33% and the average length of roots was 3.22 cm when cultured in MS 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.

Keywords: *Dendrobium gratiosissimum*, micropropagation, multi-shoot, tissue culture.

Người phản biện : PGS.TS. Hà Văn Huân

Ngày nhận bài : 05/9/2016

Ngày phản biện : 22/9/2016

Ngày quyết định đăng : 5/10/2016