

## ÁP DỤNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY LÁT MỎNG TẾ BÀO TRONG NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY LAN HOÀNG THẢO THÂN GỖ (*DENDROBIUM ADUNCUM*)

Nguyễn Thanh Tùng<sup>1,2</sup>, Lê Văn Điệp<sup>2</sup>, Nguyễn Minh Trung<sup>2</sup>, Trương Thị Bích Phượng<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

<sup>2</sup>Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

<sup>3</sup>Viện Tài nguyên Môi trường và Công nghệ Sinh học, Đại học Huế

### TÓM TẮT

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả thí nghiệm nuôi cấy lát mỏng tế bào cây lan Hoàng thảo thân gỗ (*Dendrobium aduncum*) - một loài lan rừng có giá trị của Việt Nam. Nguyên liệu ban đầu là lát cắt mỏng đoạn thân theo chiều ngang (tTCL - traverse thin cell layer) của chồi *in vitro*. Các tTCL được cảm ứng tạo protocorm - like bodies (PLB) trên môi trường cơ bản ½ MS có bổ sung riêng lẻ BAP hay bổ sung kết hợp BAP và NAA. Môi trường tối ưu cảm ứng protocorm - like bodies là môi trường ½ MS bổ sung 0,5 mg/l BAP cho 29,85 protocorm - like bodies/lát mỏng sau 8 tuần nuôi cấy. Cụm protocorm - like bodies được cấy lên môi trường MS có bổ sung TDZ, kinetin, NAA riêng lẻ hay kết hợp để tái sinh chồi. Môi trường MS bổ sung kinetin 3,0 mg/l kết hợp với NAA 0,3 mg/l cho tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất đạt 5,67 chồi/mẫu. Chồi *in vitro* được cấy lên môi trường MS bổ sung NAA để cảm ứng tạo rễ. Nồng độ NAA 2,0 mg/l là thích hợp nhất cho việc tạo rễ *in vitro* với kết quả 9,18 rễ/chồi. Cây con *in vitro* tái sinh đầy đủ được huấn luyện và trồng lên giá thể, sau 6 tuần tỷ lệ sống đạt 90%.

**Từ khóa:** Lan hoàng thảo thân gỗ, nhân giống *in vitro*, nuôi cấy lát mỏng tế bào, PLB, tái sinh chồi, tạo rễ.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Kỹ thuật nuôi cấy lát mỏng đã được phát triển hơn 30 năm qua với khả năng điều khiển biệt hóa hoa, rễ, chồi và phôi soma. Kỹ thuật này đã được áp dụng thành công trong nhân giống nhiều loài thực vật khác nhau (Da Silva, 2003) và trong chuyển gen (Nhut *et al.*, 2001).

Nuôi cấy lát mỏng tế bào đã thành công trên nhiều loài mà những phương pháp nuôi cấy truyền thống khác còn gặp khó khăn như nuôi cấy lát mỏng nhụy hoa *Citrus* (Carimi *et al.*, 1999), nuôi cấy lát mỏng đỉnh chồi và lá cây cọ dầu (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010). Phương pháp này đã mang lại kết quả quan khi nuôi cấy nhiều loài thực vật có giá trị cao như *Spilanthus acmella* (Singh *et al.*, 2009), *Sesamum indicum* (Chattopadhyaya *et al.*, 2010), *Lilium* (Nhut *et al.*, 2001; 2002).

Họ phong lan (Orchidaceae) đã được nhiều tác giả quan tâm nghiên cứu nhân giống bởi những giá trị kinh tế to lớn mà nó mang lại cũng như để bảo tồn nguồn gen quý hiếm. Một số loài lan đã được nuôi cấy lát mỏng tế bào thành công như *Rhynchostylis gigantea* (Le *et al.*, 1999), *Cymbidium* (Da Silva *et al.*, 2006), *Dendrobium candidum* (Zhao *et al.*, 2007), *Dendrobium densiflorum* (Luo *et al.*, 2008).

Hoàng thảo thân gỗ (*Dendrobium aduncum*) là loài lan rừng có hoa đẹp, lâu tàn, có thể trồng trong vườn nhà nên được rất nhiều người ưa chuộng. Loài này đã được nhân giống thành công thông qua kỹ thuật gieo hạt *in vitro* (Trương Thị Bích Phượng, Nguyễn Thanh Tùng, 2009), tuy nhiên kỹ thuật này còn nhiều hạn chế như phụ thuộc vào nguồn hạt, hiệu suất nhân giống không cao. Áp dụng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào trong nhân giống lan Hoàng thảo thân gỗ sẽ cung cấp một lượng lớn cây giống chất lượng cao, đồng đều, sạch bệnh, khắc phục hiện tượng thoái hóa và đặc biệt lưu giữ nguồn gen quý cho nhu cầu nuôi trồng và lai tạo giống.

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Cảm ứng PLB từ lát mỏng tế bào (tTCL - traverse thin cell layer)

Chồi *in vitro* được tách bỏ lá và được cắt thành những lát mỏng theo chiều ngang (tTCL) với kích thước khoảng 1,0 - 1,5 mm. Lát mỏng tế bào được cấy lên môi trường cơ bản MS có 3,0% saccharose, 0,8% agar bổ sung BAP (0,5 - 3,0 mg/l), NAA (0,3 - 1,0 mg/l) để khảo sát khả năng phát sinh PLB từ tTCL.

Tái sinh chồi từ PLB

Những PLB thu được từ thí nghiệm phát sinh PLB có sức sống tốt, được tách thành cụm nhỏ có kích thước khoảng 0,3×0,3 cm với khoảng 4 - 6 PLB, được cấy lên môi trường cơ bản MS có 3,0% saccharose, 0,8% agar, bổ sung kinetin (0,5 - 2,5 mg/l), TDZ (0,5 - 3,0 mg/l) và NAA 0,3 mg/l để khảo sát khả năng phát sinh chồi từ PLB.

Tạo rễ

Các chồi phát triển tốt thu được từ các thí nghiệm trên có thân mập, chiều cao khoảng 2 - 3 cm được cấy lên môi trường cơ bản MS có 3,0% saccharose, 0,8% agar bổ sung NAA từ 0,5 - 2,0 mg/l để khảo sát khả năng hình thành rễ.

Bước đầu trồng trên giá thể

Cây con tái sinh hoàn chỉnh cao khoảng 2 - 3 cm, có khoảng 2 - 3 rễ và 4 - 5 lá được huấn luyện thích nghi với điều kiện bên ngoài. Sau đó cây con được trồng trên giá thể rêu nước và dương xỉ (1:1) ở chế độ che sáng 50 % và tưới phun sương.

Điều kiện nuôi cấy

Mẫu mô nuôi cấy trong phòng vô trùng duy trì nhiệt độ 24 - 25<sup>0</sup>C, cường độ ánh sáng 2000 - 3000 lux, thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH 5,8 trước khi hấp khử trùng.

Cây *in vitro* hoàn chỉnh khi đưa ra giá thể được trồng trong điều kiện nhiệt độ phòng, tưới nước 2 - 3

lần/ngày.

Xử lý thống kê

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả thí nghiệm được phân tích Duncan's test bằng phần mềm SPSS 11.5 (SPSS Inc. Headquarters, United States, 2004) với mức sai khác có ý nghĩa  $p < 0,05$ .

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của BAP lên khả năng phát sinh PLB

Lát mỏng tế bào (tTCL) được cấy lên môi trường 1/2 MS bổ sung BAP từ 0,5 - 3,0 mg/l để thăm dò ảnh hưởng của BAP lên khả năng phát sinh PLB. Kết quả sau 4 và 8 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 1.

Kết quả cho thấy BAP có ảnh hưởng tốt tới khả năng cảm ứng tạo PLB trực tiếp từ tTCL. Trên môi trường 1/2 MS có bổ sung 0,5 mg/l BAP cho kết quả tốt nhất. Sau 4 tuần nuôi cấy có tỷ lệ tTCL phát sinh PLB đạt 17,5% với 26,71 PLB/tTCL (Hình 1a). Sau 8 tuần nuôi cấy có 50% tTCL phát sinh PLB với 29,85 PLB/tTCL (hình 1b). Kết quả này cao hơn hẳn so với đối chứng không bổ sung chất kích thích sinh trưởng chỉ có 7,5% tTCL phát sinh PLB với 10,33 PLB/tTCL sau 8 tuần nuôi cấy (Hình 1c).

Khi tiếp tục tăng nồng độ BAP từ 0,5 - 3,0 mg/l khả năng tạo PLB giảm dần. Kết quả thấp nhất thu được trên môi trường bổ sung 3,0 mg/l BAP với tỷ lệ tTCL phát sinh PLB chỉ đạt 12,5% với 9,00 PLB/tTCL. Điều này có thể là do nồng độ BAP cao đã gây ức chế khả năng phát sinh PLB từ tTCL.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BAP lên khả năng phát sinh PLB từ Ttcl.

| Nồng độ BAP (mg/l) | 4 tuần                  |                    | 8 tuần                  |                    |
|--------------------|-------------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|
|                    | Tỷ lệ phát sinh PLB (%) | Số PLB/tTCL        | Tỷ lệ phát sinh PLB (%) | Số PLB/tTCL        |
| 0,0                | 0,0                     | 0,0                | 7,5                     | 10,33 <sup>a</sup> |
| 0,5                | 17,5                    | 26,71 <sup>d</sup> | 50,0                    | 29,85 <sup>c</sup> |
| 1,5                | 7,5                     | 18,00 <sup>c</sup> | 20,5                    | 20,00 <sup>b</sup> |
| 2,0                | 10,1                    | 12,20 <sup>b</sup> | 17,5                    | 23,33 <sup>b</sup> |
| 3,0                | 7,5                     | 8,40 <sup>a</sup>  | 12,5                    | 9,00 <sup>a</sup>  |

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự sai khác của trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê với  $p < 0.05$  (Duncan's test).

Luo và đồng tác giả (2008) khi nuôi cấy đoạn thân *Dendrobium densiflorum* cho thấy, môi trường tối ưu cho quá trình cảm ứng PLB là môi trường bổ sung 5,0 mg/l BAP (tỷ lệ phát sinh PLB là 72% với 15,0 PLB/mẫu). Nồng độ BAP này cao hơn nồng độ BAP trong môi trường tối ưu của chúng tôi. Sự khác biệt này có thể là do sự sai khác về đối tượng nghiên cứu và kích thước mẫu nuôi cấy.

**Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và NAA lên khả năng phát sinh PLB**

Kết quả thăm dò ảnh hưởng của tổ hợp BAP (0,5 - 3,0 mg/l) và NAA (0,3 - 1,0 mg/l) lên khả năng phát sinh PLB sau 4 và 8 tuần khảo sát được trình bày ở bảng 2.

Sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường bổ sung 3,0

mg/l BAP kết hợp với 0,5 mg/l NAA kết quả cho số PLB hình thành hình thành lớn nhất đạt 24,88 PLB/tTCL với tỷ lệ tTCL phát sinh PLB là 17,5%. Trong khi đó tỷ lệ tTCL phát sinh PLB cao nhất đạt được trên môi trường 1,5 mg/l BAP kết hợp 1,0 mg/l NAA với 27,5% tTCL phát sinh PLB và trung bình 16,08 PLB/tTCL. Xét về hiệu quả số PLB thu được thì hai môi trường này gần như tương đương.

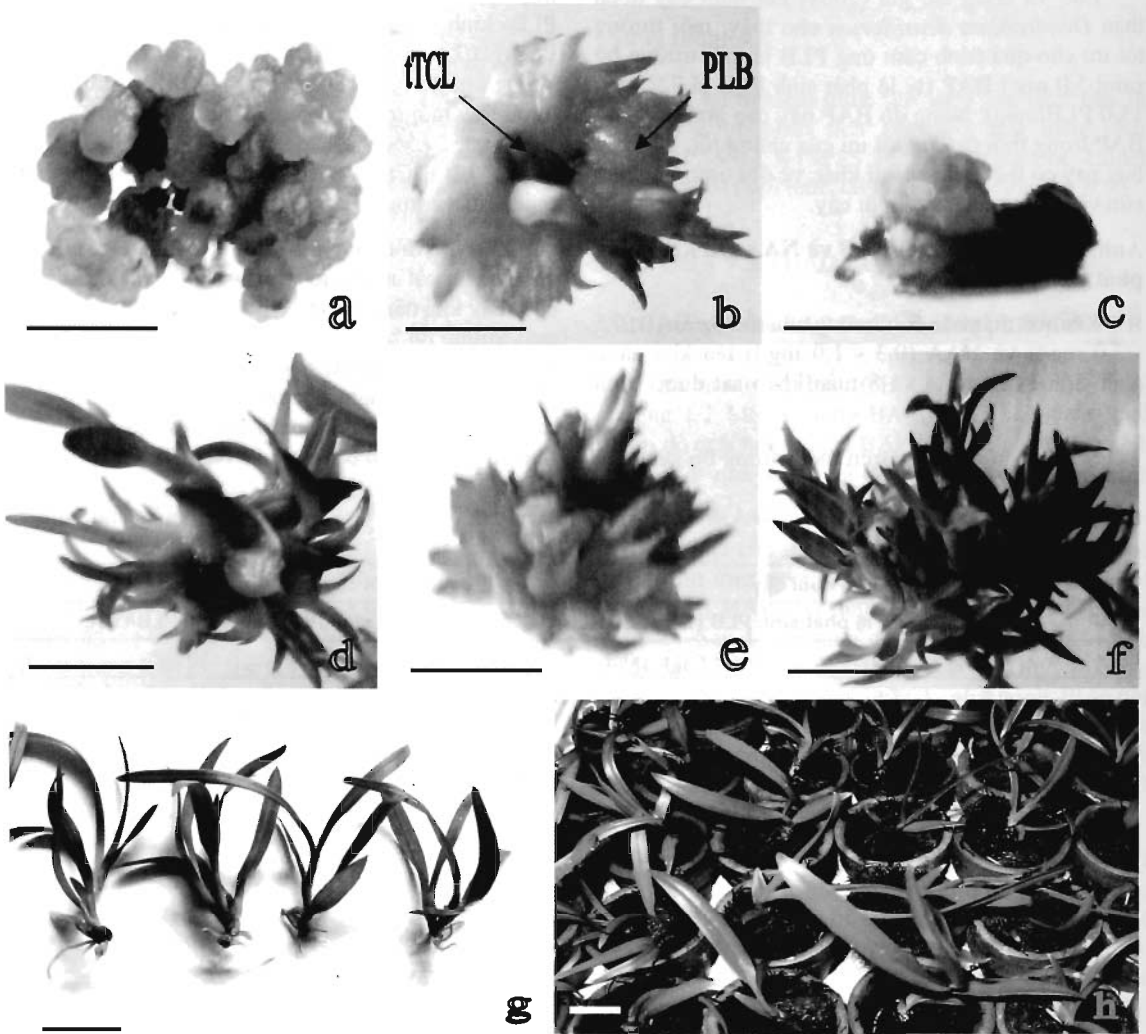
Zhao và đồng tác giả (2007) nghiên cứu tái sinh chồi từ lát cắt mỏng tế bào *Dendrobium Candidum* cho thấy khả năng tái sinh chồi tốt nhất đạt được trên môi trường bổ sung kết hợp 1,2 mg/l BA và 1,2 mg/l NAA (92% mẫu có tái sinh và 24,5 chồi/mẫu). Trong khi đó, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy môi trường bổ sung 3,0 mg/l BAP và 0,5 mg/l NAA thích hợp nhất cho cảm ứng PLB từ tTCL.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và NAA lên khả năng phát sinh PLB.

| Chất KTST (mg/l) |     | 4 tuần nuôi cấy         |                      | 8 tuần nuôi cấy         |                      |
|------------------|-----|-------------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|
| BAP              | NAA | Tỷ lệ phát sinh PLB (%) | Số PLB/tTCL          | Tỷ lệ phát sinh PLB (%) | Số PLB/tTCL          |
| 0,0              | 0,0 | 0,0                     | 0,0                  | 7,5                     | 10,33 <sup>a</sup>   |
| 0,5              | 0,3 | 7,5                     | 16,00 <sup>f</sup>   | 10,0                    | 18,75 <sup>gh</sup>  |
|                  | 0,5 | 2,5                     | 16,25 <sup>f</sup>   | 10,0                    | 19,17 <sup>gh</sup>  |
| 1,0              | 0,3 | 5,0                     | 11,75 <sup>bc</sup>  | 12,5                    | 14,83 <sup>bcd</sup> |
|                  | 0,5 | 1,0                     | 11,33 <sup>bc</sup>  | 27,5                    | 14,40 <sup>bc</sup>  |
|                  | 1,0 | 12,5                    | 6,00 <sup>a</sup>    | 25,5                    | 9,20 <sup>a</sup>    |
| 1,5              | 0,3 | 10,0                    | 14,50 <sup>def</sup> | 17,5                    | 17,50 <sup>efg</sup> |
|                  | 0,5 | 12,5                    | 10,20 <sup>b</sup>   | 22,5                    | 13,13 <sup>b</sup>   |
|                  | 1,0 | 25,0                    | 12,89 <sup>cd</sup>  | 27,5                    | 16,08 <sup>cde</sup> |
| 2,0              | 0,3 | 10,1                    | 12,83 <sup>cd</sup>  | 17,5                    | 15,89 <sup>cde</sup> |
|                  | 0,5 | 22,5                    | 10,40 <sup>b</sup>   | 22,5                    | 13,43 <sup>b</sup>   |
|                  | 1,0 | 17,5                    | 13,45 <sup>cde</sup> | 2,5                     | 16,54 <sup>def</sup> |
| 3,0              | 0,3 | 7,5                     | 15,55 <sup>ef</sup>  | 12,5                    | 18,39 <sup>fg</sup>  |
|                  | 0,5 | 15,5                    | 21,83 <sup>g</sup>   | 17,5                    | 24,88 <sup>i</sup>   |
|                  | 1,0 | 17,5                    | 16,20 <sup>f</sup>   | 17,5                    | 20,57 <sup>h</sup>   |

Phân tích Duncan's test kết quả số PLB thu được sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường bổ sung riêng lẻ BAP (Bảng 1) và môi trường bổ sung kết hợp BAP và NAA (Bảng 2) cho thấy môi trường chỉ bổ sung 0,5 mg/l BAP cho kết quả tốt nhất. Việc bổ sung NAA kết hợp BAP vào môi trường đã không làm tăng tỷ lệ tTCL phát sinh PLB cũng như số PLB hình

thành từ tTCL so với môi trường chỉ bổ sung BAP. Kết quả nghiên cứu của Luo và đồng tác giả (2008) cho thấy khi bổ sung NAA từ 0,1 - 2,0 mg/l kết hợp với BAP 5,0 mg/l thì số PLB thu được từ mẫu cấy ở loài *Dendrobium densiflorum* ít có sự sai khác. Kết quả này có thể do auxin ít có ảnh hưởng đến quá trình cảm ứng PLB từ tTCL.



**Hình 1.** Nuôi cấy lát mỏng tế bào lan Hoàng thảo thân gãy (*Dendrobium aduncum*). a, b, c. Cảm ứng PLB từ lát mỏng tế bào (tTCL), d, e, f. Tái sinh chồi từ PLB, g. Cây con *in vitro* hoàn chỉnh, h. Cây con được huấn luyện ở vườn ươm, Thanh thước 1 cm.

### Ảnh hưởng của TDZ lên khả năng tái sinh chồi từ PLB

Các PLB được chuyển lên môi trường có bổ sung TDZ 0,5 - 2,5 mg/l để thăm dò khả năng tái sinh chồi từ PLB. Sau 6 tuần nuôi cấy, kết quả được trình bày ở bảng 3.

Môi trường bổ sung TDZ (0,5 - 2,5 mg/l) đã có ảnh hưởng tích cực đến khả năng hình thành chồi từ PLB. Khi tăng nồng độ TDZ trong môi trường nuôi

cấy từ 0,5 đến 1,5 mg/l số chồi hình thành từ mẫu tăng. Trên môi trường bổ sung 1,5 mg/l TDZ, số chồi hình thành lớn nhất (4,79 chồi/mẫu). Khi tiếp tục tăng nồng độ TDZ đến 2,5 mg/l thì số chồi hình thành giảm chỉ đạt 2,75 chồi/mẫu.

Nhìn chung TDZ có tác động thúc đẩy quá trình phát triển của chồi *in vitro*. Chiều cao chồi lớn nhất (4,67 cm) đạt được trên môi trường bổ sung 2,5 mg/l TDZ (Hình 1d).

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của TDZ lên khả năng tái sinh chồi từ PLB.

| Nồng độ TDZ (mg/l) | Số chồi/mẫu        | Chiều cao chồi (cm) |
|--------------------|--------------------|---------------------|
| 0,0                | 1,30 <sup>a</sup>  | 1,26 <sup>a</sup>   |
| 0,5                | 2,13 <sup>ab</sup> | 2,06 <sup>b</sup>   |
| 1,0                | 3,14 <sup>b</sup>  | 2,16 <sup>b</sup>   |
| 1,5                | 4,79 <sup>c</sup>  | 2,32 <sup>b</sup>   |
| 2,0                | 3,00 <sup>b</sup>  | 3,10 <sup>c</sup>   |
| 2,5                | 2,75 <sup>b</sup>  | 4,67 <sup>d</sup>   |

**Ảnh hưởng của kinetin lên khả năng tái sinh chồi từ PLB**

Các PLB được chuyển lên môi trường có bổ sung kinetin 0,5 - 2,5 mg/l để thăm dò khả năng tái sinh chồi từ PLB. Sau 6 tuần nuôi cấy kết quả được trình bày ở bảng 4.

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của kinetin lên khả năng tái sinh chồi từ PLB.

| Nồng độ kinetin (mg/l) | Số chồi/mẫu       | Chiều cao chồi (cm) |
|------------------------|-------------------|---------------------|
| 0,0                    | 1,30 <sup>a</sup> | 1,26 <sup>a</sup>   |
| 0,5                    | 2,10 <sup>b</sup> | 3,00 <sup>bc</sup>  |
| 1,0                    | 2,07 <sup>b</sup> | 2,70 <sup>b</sup>   |
| 1,5                    | 2,42 <sup>b</sup> | 3,42 <sup>c</sup>   |
| 2,0                    | 3,43 <sup>c</sup> | 2,75 <sup>b</sup>   |
| 2,5                    | 2,73 <sup>b</sup> | 4,07 <sup>d</sup>   |

Khi tăng kinetin từ 0,5 - 3,0 mg/l số chồi hình thành từ mẫu tăng. Số chồi thu được lớn nhất trên môi trường bổ sung 2,0 mg/l kinetin đạt 3,43 chồi/mẫu (Hình 1e). Trong khi đó chiều cao chồi lớn nhất đạt được trên môi trường bổ sung 2,5 mg/l (đạt 4,07 cm).

**Ảnh hưởng của tổ hợp kinetin và NAA lên khả năng tái sinh chồi từ PLB**

Các PLB được chuyển lên môi trường bổ sung kinetin 0,5 - 2,5 mg/l kết hợp với NAA 0,3 mg/l để thăm dò khả năng tái sinh chồi từ PLB. Sau 6 tuần nuôi cấy kết quả được trình bày ở bảng 5.

Nhìn chung khi bổ sung kinetin (0,5 - 3,0 mg/l) kết hợp với NAA 0,3 mg/l đã thúc đẩy quá trình hình thành chồi từ cụm PLB.

Môi trường bổ sung kinetin 3,0 mg/l và NAA 0,3 mg/l có tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất đạt 5,67 chồi/mẫu với chiều cao chồi đạt 5,68 cm (Hình 1f). Trên môi trường bổ sung 1,5 - 2,0 mg/l kinetin và NAA 0,3 mg/l, chiều cao chồi lớn nhất đạt 5,88 - 6,63 cm.

**Bảng 5.** Ảnh hưởng của tổ hợp kinetin và 0,3 mg/l NAA lên khả năng tái sinh chồi từ PLB.

| Nồng độ kinetin (mg/l) | Số chồi/mẫu        | Chiều cao chồi (cm) |
|------------------------|--------------------|---------------------|
| 0,0                    | 1,30 <sup>a</sup>  | 1,26 <sup>a</sup>   |
| 0,5                    | 5,00 <sup>c</sup>  | 4,47 <sup>b</sup>   |
| 1,0                    | 4,36 <sup>b</sup>  | 5,57 <sup>c</sup>   |
| 1,5                    | 4,25 <sup>b</sup>  | 5,88 <sup>cd</sup>  |
| 2,0                    | 4,47 <sup>bc</sup> | 6,63 <sup>d</sup>   |
| 2,5                    | 4,60 <sup>bc</sup> | 5,67 <sup>c</sup>   |
| 3,0                    | 5,67 <sup>d</sup>  | 5,68 <sup>c</sup>   |

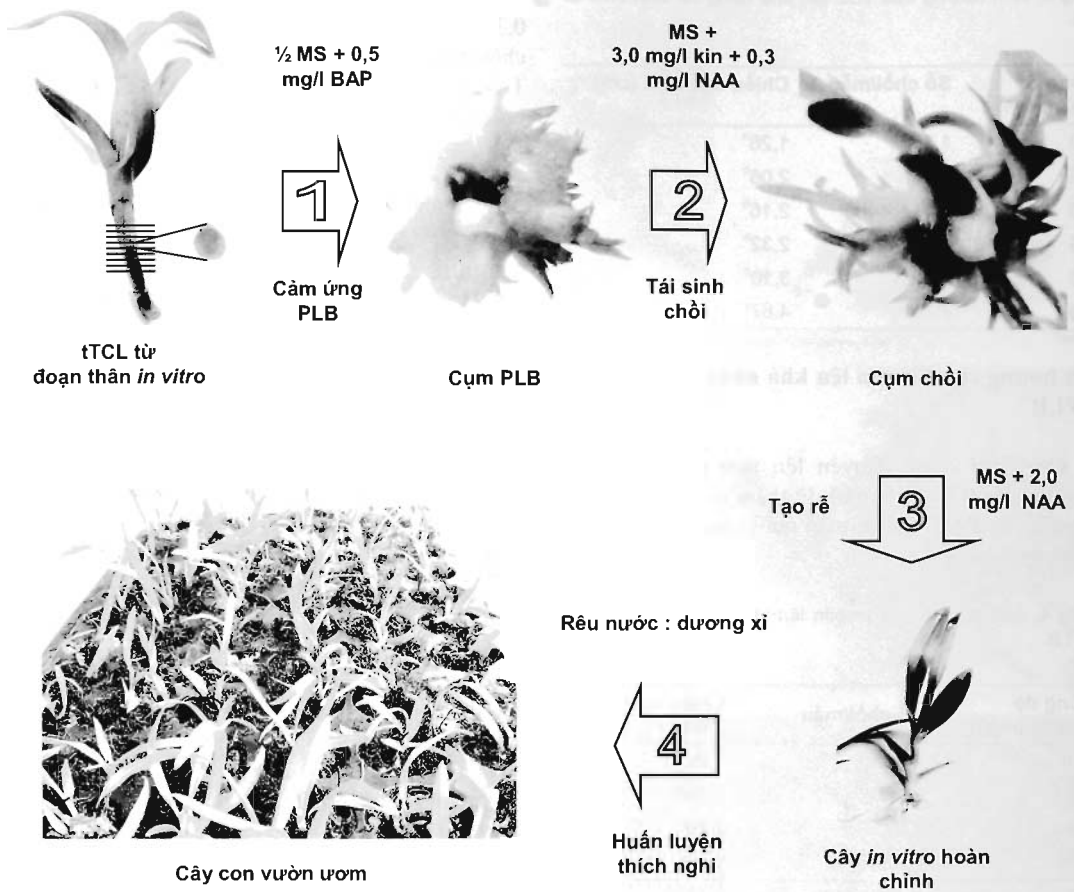
**Tạo rễ**

Các chồi *in vitro* (khoảng 2 - 3 lá) thu được từ các thí nghiệm trên được tách riêng rẽ cấy lên môi trường cơ bản MS có 3,0% saccharose, 0,8% agar và bổ sung NAA từ 0,5 - 2,0 mg/l để khảo sát khả năng hình thành rễ. Kết quả sau 4 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 6.

**Bảng 6.** Ảnh hưởng của NAA lên khả năng tạo rễ của chồi.

| Nồng độ NAA (mg/l) | Số rễ/chồi         | Chiều dài rễ (cm)  |
|--------------------|--------------------|--------------------|
| 0,0                | 1,17 <sup>a</sup>  | 0,35 <sup>a</sup>  |
| 0,5                | 2,82 <sup>ab</sup> | 0,58 <sup>ab</sup> |
| 1,0                | 4,63 <sup>b</sup>  | 0,60 <sup>ab</sup> |
| 1,5                | 3,79 <sup>b</sup>  | 0,87 <sup>b</sup>  |
| 2,0                | 9,18 <sup>c</sup>  | 1,37 <sup>c</sup>  |

Bổ sung NAA vào môi trường nuôi cấy đã có tác dụng tích cực đến sự hình thành rễ từ chồi *in vitro*. Khi tăng nồng độ NAA từ 0,5 - 2,0 mg/l đã làm tăng số rễ hình thành từ chồi cũng như chiều dài rễ. Kết quả tốt nhất thu được trên môi trường bổ sung 2,0 mg/l NAA đạt 9,18 rễ/chồi với chiều dài 1,37 cm (Hình 1g). Kết quả cao hơn hẳn so với đối chứng không bổ sung chất kích thích sinh trưởng (chỉ đạt 1,17 rễ/chồi).



Hình 2. Sơ đồ nhân giống *in vitro* lan Hoàng thảo thân gãy thông qua nuôi cấy lát mỏng tế bào.

## Trồng trên giá thể

Cây lan *in vitro* tái sinh hoàn chỉnh (khoảng 2,0 - 3,0 cm và 2 - 3 rễ và 4 - 5 lá) được huấn luyện thích nghi với điều kiện bên ngoài rồi chuyển ra trồng lên giá thể rêu nước và dương xỉ (1:1). Sau 4 tuần trồng trên giá thể tỷ lệ sống đạt được 90%, cây *ex vitro* sinh trưởng tốt, hình thành nhiều rễ mới (Hình 1h).

## KẾT LUẬN

Từ kết quả thí nghiệm, chúng tôi bước đầu đưa ra quy trình nhân giống *in vitro* lan Hoàng thảo thân gãy thông qua nuôi cấy lát mỏng tế bào (Hình 2):

1. Lát cắt mỏng đoạn thân (1,0 - 1,5 mm) được

nuôi cấy trên môi trường  $\frac{1}{2}$  MS bổ sung 0,5 mg/l BAP sau 8 tuần nuôi cấy đạt 50% tTCL phát sinh PLB với 29,85 PLB/tTCL.

2. Cụm PLB (0,3 x 0,3 cm với 4 - 6 PLB) được nuôi cấy trên môi trường MS đầy đủ bổ sung 3,0 mg/l kinetin kết hợp với 0,3 mg/l NAA sau 6 tuần nuôi cấy cho số chồi hình thành là 5,67 chồi/mẫu với chiều cao chồi đạt 5,68 cm.

3. Chồi *in vitro* tạo rễ trên môi trường MS bổ sung 2,0 mg/l NAA sau 4 tuần nuôi cấy đạt trung bình 9,18 rễ/chồi với chiều dài 1,37 cm.

4. Cây con *in vitro* hoàn chỉnh (2 - 3 cm; 2 - 3 rễ; 4 - 5 lá) được huấn luyện và trồng trên giá thể rêu nước và dương xỉ (1:1) sau 4 tuần có tỷ lệ sống sót là 90%.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anjum S, Zia M and Chaudhary F (2006) Investigations of different strategies for high frequency regeneration of *Dendrobium malones* 'Victory'. *Afr J Biotechnol* 5(19): 1738-1743
- Carimi F, Pasquale D, Crescimanno FG (1999) Somatic embryogenesis and plant regeneration from pistil thin cell layers of *Citrus*. *Plant Cell Rep* 18(11): 935-940.
- Chattopadhyaya B, Banerjee J, Basu A, Sen SK, Maiti MK (2010) Shoot induction and regeneration using internodal transverse thin cell layer culture in *Sesamum indicum* L. *Plant Biotechnol Rep* 4(2): 173-178.
- Da Silva JAT (2003) Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. *Afr J Biotechnol* 2(12): 683-691.
- Da Silva JAT, Tanaka M (2006) Multiple regeneration pathways via thin cell layers in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae). *Plant Growth Regu* 25(3): 203-210.
- Le BV, Phuong NTH, Hong LTA, Van TTK (1999) High frequency shoot regeneration from *Rhynchostylis gigantea* (orchidaceae) using thin cell layers. *Plant Growth Regu* 28(3): 179-185.
- Luo JP, Ying W, Zha XQ, Huang L (2008) Micropropagation of *Dendrobium densiflorum* Lindl. ex Wall. through protocorm-like bodies: effects of plant growth regulators and lanthanoids. *Plant Cell Tiss Org Cult* 93: 333-340.
- Nhut DT, Le BV, Minh NT, de Silva JT, Fukai S, Tanaka M, Van TTK (2002) Somatic embryogenesis through pseudo-bulblet transverse thin cell layer of *Lilium longiflorum*. *Plant Growth Regu* 37(2): 193-198.
- Nhut DT, Le V, de Silva JT, Aswath CR (2001) Thin cell layer culture system in *Lilium*: Regeneration and transformation perspectives. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37(5): 516-523.
- Scherwinski-Pereira JE, da Guedes RS, Fermino PCP Jr, Silva TL, Costa FHS (2010) Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 46(4): 378-385.
- Singh SK, Rai MK, Asthana P, Sahoo L (2009) An improved micropropagation of *Spilanthes acmella* L. through transverse thin cell layer culture. *Acta Physiol Plant* 31(4): 693-698.
- Trương Thị Bích Phượng, Nguyễn Thanh Tùng (2009) Nhân giống *in vitro* cây lan Hoàng thảo thân gãy (*Dendrobium aduncum*). *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc khu vực phía Nam*: 247-251.
- Zhao P, Wang W, Feng FS, Wu F, Yang ZQ, Wang WJ (2007) High-frequency shoot regeneration through transverse thin cell layer culture in *Dendrobium Candidum* Wall Ex Lindl. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 90:131-139.

## APPLICATION OF THIN CELL LAYER CULTURE METHOD IN MICROPROPAGATION OF *DENDROBIUM ADUNCUM*

Nguyen Thanh Tung<sup>1,2</sup>, Le Van Diep<sup>2</sup>, Nguyen Minh Trung<sup>2</sup>, Truong Thi Bich Phuong<sup>2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> College of Medicine and Pharmacy, Hue University

<sup>2</sup> College of Sciences, Hue University

<sup>3</sup> Institute of Resources, Environment and Biotechnology, Hue University

### SUMMARY

*Dendrobium aduncum* micropropagation using thin cell layer technique was studied. Traverse thin cell layer (tTCL) explants excised from the stem of *in vitro* plants were cultured on a half-strength MS medium supplemented with BAP alone or combination of BAP and NAA. The highest number of protocorm-like bodies (PLBs) per tTCL was obtained on half-strength MS medium containing 0.5 mg/l BAP (29.85 PLBs/TCL). Maximum shoot regeneration was obtained on full-strength MS medium containing combination of kinetin 3.0 mg/l and NAA 0.3 mg/l (5.67 shoots/explant). The best rooting occurred at 2.0 mg/l NAA (9.18 roots/shoot). The well developed rooted plantlets were hardened successfully in the potting mixture containing sphagnum moss and fern in the ratio of 1:1.

**Keywords:** *Dendrobium aduncum*, micropropagation, protocorm-like bodies, rooting, shoot regeneration, thin cell layer

\* Author for correspondence: E-mail: [ttbphuongdt@gmail.com](mailto:ttbphuongdt@gmail.com)