

Nhân giống *in vitro* cây lan Hoàng thảo U lồi (*Dendrobium wardianum*)

Nguyễn Thị Lại^{*}, Nguyễn Thị Bình¹, Nguyễn Thị Ngọc Bích¹, Phạm Minh Khoa²

¹Trung tâm Ươm tạo Công nghệ và Doanh nghiệp Khoa học Công nghệ,

Viện Ứng dụng Công nghệ, C6, phường Thanh Xuân Bắc, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Trường THPT Chuyên Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên,
Đại học Quốc gia Hà Nội, 182 Lương Thế Vinh, phường Thanh Xuân Bắc, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 6/10/2022; ngày chuyển phản biện 8/10/2022; ngày nhận phản biện 31/10/2022; ngày chấp nhận đăng 4/11/2022

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nhân giống cây lan Hoàng thảo U lồi (*Dendrobium wardianum*) bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. Kết quả cho thấy, nhân nhanh thể sinh chồi (protocorm) tốt nhất trên môi trường MS bổ sung 2,0 mg/l BAP, 1 mg/l IBA và 40 g/l chuối nghiền sau 8 tuần nuôi cấy với hệ số nhân protocorm đạt 18,8 lần; môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l KIN, 30 g/l cà rốt nghiền là tốt nhất đến sự tái sinh chồi *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy, với 32,58 chồi/mẫu, chiều cao chồi 2,5 cm và 3,5 lá/chồi. Chồi ra rễ *in vitro* tốt nhất trên môi trường MS được bổ sung 1 mg/l αNAA, 30 g/l cà rốt nghiền với số lượng rễ trung bình cao nhất 10,8 rễ/chồi và chiều dài rễ trung bình dài nhất 3,01 cm sau 6 tuần nuôi cấy. Hỗn hợp rêu rừng, đá bọt núi lửa, xơ dừa (tỷ lệ 30:30:40) được xác định là giá thể phù hợp nhất cho sự sinh trưởng của cây con trong điều kiện vườn ươm sau 6 tuần nuôi trồng, với tỷ lệ sống đạt 96,6%, chiều cao cây đạt 9,10 cm, 8,7 lá/cây và 3,8 rễ mới/cây.

Từ khóa: Hoàng thảo U lồi, lan rừng, nhân giống *in vitro*, nhân nhanh thể sinh chồi.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Lan Hoàng thảo U lồi (*Dendrobium wardianum*) thuộc chi Hoàng thảo (*Dendrobium*) là loài lan rừng đẹp, có mùi hương rất thơm, có giá trị y học và thương mại cao. Trên thế giới, lan Hoàng thảo U lồi có nhiều ở Ấn Độ, Butan, Trung Quốc, Myanmar, Thái Lan. Ở Việt Nam, chúng phân bố chủ yếu tại Lào Cai (Sa Pa), Ninh Bình (Cúc Phương)... Lan Hoàng thảo U lồi chủ yếu sống phụ sinh trên thân, cành cây ở trong rừng hoặc trên các hốc mùn trên đá, thường ở nơi ẩm, mọc ở độ cao 200-1200 m.

Lan Hoàng thảo U lồi có tác dụng chống ôxy hóa và chống tế bào ung thư ở người (các dòng tế bào khối u HL-60, A-549, SMMC-7721, MCF-7 và SW-480) với IC50 2,33-38,48 μM... [1].

Những năm gần đây, do nạn phá rừng và tình trạng khai thác một cách tận diệt, mặt khác khả năng nảy mầm trong môi trường sống tự nhiên rất thấp vì hạt lan không chứa nội nhũ, cần phải cộng sinh của một số loại nấm thuộc chi *Rhizoctonia* mới nảy mầm được, nên loài lan Hoàng thảo U lồi có nguy cơ tuyệt chủng và được đưa vào Sách Đỏ Việt Nam [2]. Nhân giống lan Hoàng thảo bằng phương pháp truyền thống (tách chồi, cắt đoạn thân...) mất nhiều thời gian và không hiệu quả [3]. Kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* là phương pháp được sử dụng nhiều trong nhân giống nhiều loại lan quý hiếm thuộc chi lan Hoàng thảo, tạo ra được một số lượng cây giống lớn có chất lượng cao, sạch bệnh trong thời gian ngắn và chi phí thấp. Đây là biện pháp góp phần bảo vệ, phát triển nguồn gen của loài thực vật quý hiếm này.

^{*}Tác giả liên hệ: Email: orchidnlai@gmail.com

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Mẫu lan Hoàng thảo U lồi (*Dendrobium wardianum*) được thu thập ở Vườn quốc gia Cúc Phương, Ninh Bình. Quả lan sau khi thụ phấn được 10 tháng sử dụng để làm vật liệu nuôi cấy khởi đầu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Khử trùng mẫu và nảy mầm hạt: Quả lan sau khi thu hái được rửa sạch bằng xà phòng dưới vòi nước chảy và ngâm trong dung dịch presept 0,5% trong 10 phút, sau đó rửa lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng, cuối cùng ngâm trong dung dịch javel 30% trong 10 phút và rửa lại 3 lần với nước cất vô trùng. Hạt được tách ra và gieo trên môi trường cơ bản VW (Vacin & Went), MS (Murashige & Shoog) và RE (Robert Ernst) có bổ sung 20 g/l sucrose, 6 g/l agar, 100 ml/l nước dừa + 2 mg/l Benzylaminopurine (BAP). Tỷ lệ hạt nảy mầm (%), thời gian xuất hiện protocorm (ngày) được đánh giá sau 6 tuần nuôi cấy.

Nhân nhanh protocorm: Protocorm được tách thành từng khối có đường kính khoảng 0,5x0,5 cm được cấy chuyển qua môi trường MS + 20 g/l sucrose + 6 g/l agar + 100 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính bổ sung 2 mg/l BAP + 0-2 mg/l Indole-3-butyric acid (IBA); 2 mg/l BAP + 1 mg/l IBA + 0-50 g/l dịch chuối nghiền để khảo sát khả năng nhân nhanh protocorm. Hệ số nhân protocorm (lần) và đặc điểm hình thái của protocorm được đánh giá sau 8 tuần nuôi cấy.

In vitro propagation of the *Dendrobium wardianum*

Thi Lai Nguyen^{1*}, Thi Binh Nguyen¹,
Thi Ngoc Bich Nguyen¹, Minh Khoa Pham²

¹Nacentech Technology and Business Incubator Center, National Center for Technological Progress, C6, Thanh Xuan Bac Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

²HUS High School for Gifted Students, University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 182 Luong The Vinh Street, Thanh Xuan Bac Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 6 October 2022; revised 31 October 2022; accepted 4 November 2022

Abstract:

In the present study, we investigated the propagation of *Dendrobium wardianum* by *in vitro* culture technique. The results showed that: the most suitable protocorm multiplication medium is MS medium supplemented with 2 mg/l BAP, 1 mg/l IBA, 40 g/l mashed banana after 8 weeks of culture, with a protocorm multiplier of 18.8; MS medium supplemented with 1.5 mg/l KIN, 30 g/l mashed carrot gave the best on *in vitro* shoot regeneration after 8 weeks of culture, with 32.58 shoots/explant, shoot height of 2.5 cm and 3.5 leaves/shoot. Shoots were rooted well on MS medium supplemented with 1 mg/l α NAA, 30 g/l mashed carrot with the highest mean number of roots (10.8 roots per shoot) and the longest mean root length (3.01 cm) after 6 weeks of culture. In the nursery, a mixture of forest moss, volcanic pumice, and coconut fibre (30:30:40) ratio was regarded as the best substrate due to the high survival rate of plantlets (96.6%) and healthy plantlets (9.10 cm in height with 8.7 leaves and 3.8 new roots/plantlet) at 6 weeks after planting.

Keywords: *Dendrobium wardianum*, *in vitro* propagation, protocorm, wild orchids.

Classification number: 4.6

Tái sinh chồi từ protocorm: Protocorm được cấy vào môi trường MS + 20 g/l sucrose + 6 g/l agar + 100 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính, bổ sung 0-2,0 mg/l Kinetin (KIN); 1,5 mg/l KIN + 0-50 g/l cà rốt nghiền để thăm dò khả năng tạo chồi. Số chồi/mẫu (chồi), chiều cao chồi (cm), số lá/chồi (lá) và chất lượng chồi được đánh giá sau 8 tuần nuôi cấy.

Tạo rễ từ chồi *in vitro*: Các chồi *in vitro* có chiều cao 2-3 cm, 2-3 lá, chồi khô chưa có rễ được tách ra và cấy sang môi trường ra rễ có bổ sung 0-2,0 mg/l α -naphthalene acetic acid (α NAA), 20 g/l sucrose, 6,0 g/l agar, 100 ml/l nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, 30 g/l dịch cà rốt nghiền để khảo sát khả năng hình thành rễ. Chiều cao cây (cm), số lá (lá), số rễ (rễ), chiều dài rễ (cm) và chất lượng rễ được đánh giá sau 6 tuần nuôi cấy.

Đưa cây *in vitro* ra vườn ươm: Các cây con *in vitro* có chiều cao 5-6 cm, 3-5 rễ và 3-4 lá. Cây con được rửa hết agar, rải đều trên khay sạch để trong 1 giờ, sau đó trồng vào chậu đất nung kích thước 12x10 cm trên các giá thể: rêu rừng, đá bọt núi lửa, xơ dừa (tỷ lệ 30:30:40), sau khi cây trồng được 2 tuần phun phân bón lá Growmore (30:10:10) liều lượng 1 g/l/lần/tuần, để khảo sát khả năng sinh trưởng của cây *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm. Các chỉ tiêu theo dõi tỷ lệ sống (%), chiều cao cây (cm), số lá (lá), số rễ mới xuất hiện (rễ) và chất lượng cây được đánh giá sau 6 tuần nuôi cấy.

Phương pháp xử lý số liệu: Sử dụng phần mềm Excel 2010 để hệ thống hoá các thông tin, số liệu phục vụ phân tích, đánh giá. Các số liệu được xử lý và phân tích thống kê bằng phần mềm IRRISTAT5.0.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian thực hiện: Tháng 1/2022-10/2022.

Địa điểm: Trung tâm Ươm tạo Công nghệ và Doanh nghiệp Khoa học Công nghệ, Viện Ứng dụng Công nghệ.

Điều kiện nuôi cấy *in vitro*: Nhiệt độ phòng 25±2°C, ẩm độ 65-70%, thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 2.000-2.500 lux.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tạo vật liệu khởi đầu

Ảnh hưởng của môi trường khoáng VW, MS, RE khác nhau đến khả năng nảy mầm của hạt được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường khoáng khác nhau đến giai đoạn tạo vật liệu khởi đầu.

Môi trường khoáng	Tỷ lệ hạt nảy mầm (%)	Thời gian xuất hiện Protocorm (tuần)
VW	95 ^b	5 ^b
MS	100 ^a	4 ^c
RE	86 ^c	6 ^a
LSD _{0,05}	2,2	1,5
CV (%)	2,61	1,8

Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả bảng 1 cho thấy, sau 6 tuần nuôi cấy tỷ lệ hạt nảy mầm và thời gian xuất hiện protocorm của lan Hoàng thảo U lồi trên môi trường khoáng khác nhau là không giống nhau. Trên nền môi trường MS, tỷ lệ nảy mầm của hạt lan là cao nhất (đạt 100%) và thời gian xuất hiện protocorm ngắn nhất (chỉ 4 tuần); tỷ lệ hạt nảy mầm nền môi trường VW (đạt 95%), thời gian xuất hiện protocorm ở mức trung bình (5 tuần). Nền môi trường RE cho tỷ lệ nảy mầm của hạt khá

thấp (86%) và thời gian xuất hiện protocorm dài hơn so với 2 nền môi trường trên (6 tuần). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của S.M. Abbaszadeh và cs (2018) [3] là sử dụng môi trường MS thích hợp thì tỷ lệ nảy mầm của hạt đạt 94% với lan *Phalaenopsis* ‘Bahia Blanca’ và 95,27% với lan *D. hookerianum* [4].

3.2. Nhân nhanh protocorm

Ảnh hưởng của BAP + IBA đến khả năng nhân nhanh protocorm được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP + IBA đến khả năng nhân nhanh protocorm.

Nồng độ BAP (mg/l)	Nồng độ IBA (mg/l)	Hệ số nhân protocorm (lần)	Đặc điểm hình thái của protocorm
2,0	0,0	3,5 ^d	Nhỏ, màu xanh nhạt
2,0	0,5	8,2 ^b	Khỏe, màu xanh
2,0	1,0	10,3 ^a	Khỏe, màu xanh
2,0	1,5	5,8 ^c	Gầy, màu xanh nhạt
2,0	2,0	2,8 ^c	Gầy, có hiện tượng màu vàng và chết
LSD _{0,05}		0,56	
CV (%)		3,4	

Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, sự kết hợp giữa BAP + IBA có ảnh hưởng hiệu quả đến khả năng hình thành protocorm. Ở nồng độ 1 mg/l IBA kết hợp với 2 mg/l BAP cho hệ số nhân protocorm cao nhất đạt 10,3 protocorm (lần), protocorm xanh và khỏe. Khi tăng nồng độ IBA lên 1,5-2 mg/l hệ số nhân protocorm giảm dần, thậm chí còn thấp hơn so với đối chứng, protocorm gầy, có hiện tượng màu vàng và chết. Nguyên nhân do IBA ở nồng độ cao làm ức chế khả năng phát sinh protocorm, kìm hãm sự phát triển của khối protocorm. Do vậy, có thể kết luận rằng nồng độ 1 mg/l IBA kết hợp với 2 mg/l BAP thích hợp cho quá trình tạo protocorm của cây lan Hoàng thảo U lồi.

3.3. Ảnh hưởng của dịch nghiền chuối đến khả năng nhân nhanh protocorm

Trong quá trình nuôi cấy *in vitro*, việc bổ sung các hợp chất hữu cơ tự nhiên vào môi trường sẽ có tác dụng thúc đẩy sinh trưởng và phát triển của mẫu cấy. Theo Y. Hasanah và cs (2020) [5], trong quả chuối có chứa một số chất điều hòa sinh trưởng thực vật tự nhiên như: IAA, gibberellin, cytokinin, sắt; kali, vitamin B6, B12, tryptophan thúc đẩy protocorm tăng trưởng [6]. Để tìm hiểu ảnh hưởng của dịch nghiền chuối đến quá trình nhân nhanh protocorm, chúng tôi tiến hành bổ sung dịch nghiền chuối với các hàm lượng khác nhau vào môi trường nuôi cấy (bảng 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của dịch nghiền chuối đến khả năng nhân nhanh protocorm.

Dịch nghiền chuối (g/l)	Hệ số nhân protocorm (lần)	Đặc điểm hình thái của protocorm
0 (đối chứng)	10,2 ^f	Khỏe, màu xanh
10	12,7 ^e	Khỏe, màu xanh
20	13,5 ^d	Khỏe, màu xanh
30	15,8 ^c	Khỏe, màu xanh đậm
40	18,8 ^a	To, khỏe, màu xanh đậm
50	17,5 ^b	To, khỏe, màu xanh đậm
LSD _{0,05}		0,50
CV (%)		2,0

Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả từ bảng 3 cho thấy, dịch nghiền chuối có tác dụng hiệu quả với quá trình nhân nhanh protocorm. Bổ sung dịch nghiền chuối hàm lượng 40 g/l cho hệ số nhân protocorm đạt cao nhất 18,8 protocorm (lần), trong khi đối chứng môi trường không bổ sung dịch nghiền chuối chỉ đạt 10,2 protocorm (lần). Theo nghiên cứu của M.O. Islam và cs (2016) [7], khi bổ sung 100 ml dịch chiết chuối vào môi trường nuôi cấy có tác dụng kích thích sự hình thành và phát triển chồi từ protocorm với lan *Dendrobium* sp.. Bổ sung dịch chiết chuối 10 g/l vào môi trường VW cho hệ số nhân protocorm đạt cao nhất đối với lan *Phalaenopsis amboinensis* [8], khả năng hình thành protocorm tốt nhất trên môi trường MS bổ sung 50 g/l dịch chuối với lan *Cymbidium pendulum* [9]. Kết quả của chúng tôi đã phản ánh sự sai khác so với các nghiên cứu trước, có thể do giống và trên nền môi trường nuôi cấy khác nhau. Như vậy, hàm lượng dịch nghiền chuối 40 g/l thích hợp cho việc nhân protocorm lan Hoàng thảo U lồi.

3.4. Tái sinh chồi từ protocorm

Ảnh hưởng của KIN đến khả năng tái sinh chồi từ protocorm được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của KIN đến khả năng tái sinh chồi từ protocorm.

Nồng độ KIN (mg/l)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi (lá)	Chất lượng chồi
0,0 (đối chứng)	2,5 ^d	0,70 ^b	1,5 ^d	Chồi nhỏ, lá xanh nhạt
0,5	7,9 ^b	0,93 ^{ab}	1,8 ^c	Chồi nhỏ, lá xanh
1,0	8,7 ^b	1,10 ^{ab}	2,3 ^b	Chồi bình thường, lá xanh
1,5	12,5 ^a	1,36 ^a	2,6 ^a	Chồi to, lá xanh
2,0	6,6 ^c	0,75 ^b	2,1 ^b	Chồi có biểu hiện biến dị, nhỏ và vàng
LSD _{0,05}		0,80	0,5	0,2
CV (%)		1,8	2,3	3,0

Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, bổ sung KIN nồng độ 0-1,5 mg/l thì sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cũng tăng lên. Ở nồng độ 1,5 mg/l KIN khả năng tái sinh chồi từ protocorm đạt cao nhất: số chồi/mẫu là 12,5 chồi, chiều cao chồi đạt 1,36 cm, số lá đạt 2,6 lá. Tuy nhiên, khi nồng độ KIN tăng lên 2 mg/l thì sự hình thành chồi và sinh trưởng chồi giảm xuống, chồi có biểu hiện biến dị, nhỏ và vàng, có thể giải thích KIN ở nồng độ cao ức chế protocorms phát triển thành chồi cây. Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của T.Q. Dan và cs (2018) [10] trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l KIN thuận lợi nhất cho sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi lan *Renanthera imschootiana* Rolfe.

Ảnh hưởng của dịch nghiền cà rốt đến khả năng tái sinh chồi từ protocorm được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của dịch nghiền cà rốt đến khả năng tái sinh chồi từ protocorm.

Hàm lượng dịch nghiền cà rốt (g/l)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi (lá)	Chất lượng chồi
0,0 (đối chứng)	12,3 ^f	1,34 ^d	2,5 ^d	Chồi to, lá xanh
10	19,8 ^e	1,40 ^d	3,0 ^e	Chồi to, khỏe, lá xanh
20	24,0 ^d	1,46 ^d	3,2 ^e	Chồi to, khỏe, lá xanh
30	32,58 ^c	2,5 ^a	3,5 ^e	Chồi to khỏe, lá to màu xanh đậm
40	28,6 ^b	1,75 ^b	3,4 ^e	Chồi to, khỏe, lá to màu xanh đậm
50	26,2 ^c	1,70 ^b	2,9 ^e	Chồi to, lá màu xanh
LSD _{0,05}	0,64	0,28	0,19	
CV (%)	1,7	2,1	3,7	

Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả ở bảng 5 cho thấy, dịch nghiền cà rốt đã ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng phát sinh chồi từ protocorm. Các hàm lượng dịch nghiền cà rốt khác nhau, sự phát sinh chồi từ protocorm cũng khác nhau, ở hàm lượng 30 g/l dịch nghiền cà rốt bổ sung vào môi trường cho kết quả tốt nhất, với số chồi 32,58 chồi/mẫu, chiều cao đạt 2,5 cm, số lá/chồi là 3,5 lá. Điều này có thể do trong dịch nghiền cà rốt giàu carbohydrate, Ca, P, Fe, Mg [11] và cytokinin, vitamin, axit amin, sterol nội sinh [12] có tác dụng tăng khả năng tái sinh chồi từ protocorm và sự sinh trưởng của chồi. Tuy nhiên, khi tăng hàm lượng dịch nghiền cà rốt lên 40-50 g/l thì khả năng tái sinh chồi từ protocorm và sự sinh trưởng của chồi có xu hướng giảm dần. Khi hàm lượng dịch nghiền cà rốt trong môi trường nuôi cấy quá cao làm ức chế sự tái sinh của chồi, có thể do áp lực thẩm thấu của môi trường cao và ngăn chặn sự hấp thu nước và các chất cần thiết cho sự phát triển của chồi. Như vậy, hàm lượng dịch nghiền cà rốt 30 g/l thích hợp cho việc tái sinh chồi cũng như sinh trưởng phát triển của chồi, chồi to khỏe, lá to màu xanh đậm.

3.5. Nghiên cứu tạo cây in vitro hoàn chỉnh

Ảnh hưởng của α NAA đến khả năng tạo rễ cây con in vitro được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của α NAA đến khả năng tạo rễ cây con in vitro.

Nồng độ α NAA (mg/l)	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá)	Số rễ (rễ)	Chiều dài rễ (cm)	Chất lượng rễ
0 (đối chứng)	3,73 ^e	3,5 ^e	4,03 ^e	1,32 ^d	Rễ nhỏ, ngắn, màu trắng
0,5	6,02 ^c	5,8 ^c	7,10 ^c	2,15 ^c	Rễ nhỏ, ngắn, màu trắng
1,0	7,2 ^a	6,6 ^a	10,8 ^a	3,01 ^a	Rễ mập, dài, khỏe, màu trắng đục, chóp rễ xanh
1,5	6,30 ^b	6,10 ^b	7,60 ^b	2,50 ^b	Rễ nhỏ, dài, màu xanh nhạt
2,0	4,52 ^d	4,9 ^d	5,15 ^d	2,20 ^c	Rễ nhỏ, ngắn, đầu rễ đen
LSD _{0,05}	0,13	0,16	0,27	0,07	
CV%	1,2	1,6	2,1	1,6	

Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả ở bảng 6 cho thấy, tất cả các công thức thí nghiệm đều hình thành rễ, điều này cho thấy cây lan Hoàng thảo U lồi là một loài lan dễ tái sinh rễ in vitro. Tuy nhiên, ở những môi trường khác nhau thì khả năng tạo rễ có sự khác nhau, môi trường bổ sung 1 mg/l α NAA bổ sung vào môi trường nuôi cấy sau 6 tuần theo dõi cây đạt các chỉ tiêu sinh trưởng tốt nhất, chiều cao cây đạt 7,2 cm, số lá đạt 6,6 lá/cây, số rễ (10,8 rễ/cây), chiều dài rễ đạt 3,01 cm, rễ mập, dài, khỏe, màu trắng đục, chóp rễ xanh. Khi nồng độ α NAA tăng lên 1,5-2 mg/l thì giảm số lượng rễ tạo thành, rễ ngắn, nhỏ màu xanh nhạt, hiện tượng này có thể do nồng độ auxin tăng, làm ức chế quá trình ra rễ. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của L.T. Vinh và cs (2022) [13] trên môi trường bổ sung 1 mg/l α NAA thuận lợi nhất cho sự ra rễ in vitro lan *D. anosmum* và cây Vanilla [14].

3.6. Đưa cây in vitro ra vườn ươm

Ảnh hưởng của các loại giá thể đến tỷ lệ sống của cây con in vitro được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Ảnh hưởng của các loại giá thể đến tỷ lệ sống của cây con in vitro (sau 6 tuần nuôi trồng).

Loại giá thể	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá)	Số rễ mới xuất hiện (rễ)	Chất lượng cây
G1	76,0 ^c	7,35 ^b	5,7 ^d	2,5 ^b	Cây yếu, lá nhỏ, màu xanh nhạt, rễ mới hình thành ít
G2	78,3 ^b	7,62 ^b	6,9 ^b	2,7 ^b	Cây yếu, lá xanh nhạt và nhỏ, rễ mới hình thành ít
G3	70,1 ^d	6,23 ^c	6,5 ^c	2,2 ^c	Cây nhỏ yếu, lá xanh nhạt, rễ mới hình thành ít
G4	96,6 ^a	9,10 ^a	8,7 ^a	3,8 ^a	Cây to khỏe, lá xanh đậm, ra rễ mới nhiều, rễ xanh, này chồi con
LSD _{0,05}	1,54	0,62	0,33	0,20	
CV%	4,7	4,2	2,4	3,5	

Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%. G1: rêu rừng; G2: đá bọt núi lửa; G3: xơ dừa; G4: hỗn hợp rêu rừng, đá bọt núi lửa và xơ dừa (tỷ lệ 30:30:40).

Kết quả ở bảng 7 cho thấy, giá thể có ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây con ở giai đoạn vườn ươm. Trên giá thể rêu rừng, đá bọt núi lửa, xơ dừa, các chỉ tiêu tỷ lệ sống chỉ đạt 70,1-78,3%, cây nhỏ yếu, lá xanh nhạt, rễ mới hình thành ít. Cây trồng trên giá thể gồm rêu rừng, đá bọt núi lửa và xơ dừa (tỷ lệ 30:30:40) cho tỷ lệ sống cao nhất (96,6%), khả năng sinh trưởng cũng tốt nhất (chiều cao cây đạt 9,10 cm với 3,8 rễ mới và 8,7 lá/cây), cây khỏe, thân cứng, rễ bám tốt vào giá thể và xuất hiện nhiều rễ mới, hỗn hợp giá thể này có độ thoáng khí, bộ rễ có thể hô hấp tốt đồng thời vẫn có khả năng giữ ẩm tốt, nâng cao hiệu quả ra cây. Như vậy, trên nền giá thể gồm rêu rừng, đá bọt núi lửa và xơ dừa (tỷ lệ 30:30:40) có độ thoáng và giữ ẩm thích hợp cho cây con thích nghi và sinh trưởng.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường nhân nhanh protocorm tối ưu là MS bổ sung 2 mg/l BAP, 1 mg/l IBA, 40 g/l dịch nghiền chuối.

Môi trường thích hợp nhất cho tái sinh chồi từ protocorm là MS bổ sung 1,5 mg/l KIN, 30 g/l dịch nghiền cà rốt.

Môi trường MS bổ sung 30 g/l dịch nghiền cà rốt, 1 mg/l α NAA thích hợp cho cây *in vitro* tạo rễ, với số rễ đạt được cao nhất là 10,8 rễ/cây.

Giá thể phù hợp nhất cho cây con ở giai đoạn vườn ươm là hỗn hợp rêu rừng, đá bọt núi lửa và xơ dừa (tỷ lệ 30:30:40) cho tỷ lệ cây con sống đạt (96,6%), cây to khỏe, lá xanh đậm, ra rễ mới nhiều, rễ xanh.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ đã hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] C. Zhang, S.J. Liu, L. Yang, et al. (2017), "Sesquiterpene amino ether and cytotoxic phenols from *Dendrobium wardianum* Warner", *Fitoterapia*, **122**, pp.76-79, DOI: 10.1016/j.fitote.2017.08.015.

[2] Ministry of Science and Technology, Vietnamese Academy of Science and Technology (2007), *Vietnam Red Data Book. Part II. Plants*, Natural Science and Technology Publishing House, pp.438-439 (in Vietnamese).

[3] S.M. Abbaszadeh, S.M. Miri, R. Naderi (2018), "An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of phalaenopsis 'Bahia Blanca'", *Journal of Ornamental Plants*, **8(3)**, pp.183-192.

[4] S. Paul, S. Kumaria, P. Tandon (2012), "An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and large scale *in vitro* regeneration of *Dendrobium hookerianum* a threatened orchid of northeast India", *AOB Plants*, **2012**, DOI: 10.1093/aobpla/plr012.

[5] Y. Hasanah, L. Mawarni, C. Hanum (2020), "Effect of coconut water and banana hump extract on the growth of binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) accessions from lowland", *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, **591**, DOI 10.1088/1755-1315/591/1/012004.

[6] P. Gnasekaran, X. Rathinam, U.R. Sinniah, et al. (2010), "A study on the use of organic additives on the protocorm-like bodies (PLBS) growth of *Phalaenopsis violacea* orchid", *J. Phycol.*, **2(1)**, pp.29-33.

[7] M.O. Islam, M.S. Islam, M.A. Saleh, et al. (2016), "Effect of banana extract on growth and development of protocorm like bodies in *Dendrobium* sp. orchid", *The Agriculturists*, **13(1)**, pp.101-108.

[8] E.S.W. Utami, S. Hariyanto (2019), "*In vitro* seed germination and seedling development of a rare Indonesian native orchid *Phalaenopsis amboinensis* J.J.Sm.", *Scientifica*, **2019**, DOI: 10.1155/2019/8105138.

[9] S. Kaur, K.K. Bhutani (2012), "Organic growth supplement stimulants for *in vitro* multiplication of *Cymbidium pendulum* (Roxb) Sw.", *Horticultural Science (Prague)*, **39(1)**, pp.47-52.

[10] T.Q. Dan, N.M. Ly, V.C. Tuan (2018), "*In vitro* propagation of a precious orchid species *Renanthera imschootiana* Rolfe", *The University of Danang - Journal of Science and Technology*, **3(124)**, pp.89-93 (in Vietnamese).

[11] K.D. Sharma, S. Karki, N.S. Thakur, et al. (2012), "Chemical composition, functional properties, and processing of carrot - A review", *J. Food Sci. Tech.*, **49(1)**, pp.22-32, DOI: 10.1007/s13197-011-0310-7.

[12] D. Puchooa, R. Ramburn (2004), "A study on the use of carrot juice in the tissue culture of *Daucus carota*", *Afr. J. Biotechnol.*, **3(4)**, pp.248-252, DOI: 10.5897/AJB2004.000-2045.

[13] L.T. Vinh, T.T.L. Na, N.T.B. Thu, et al. (2022), "*In vitro* propagation of *Dendrobium anosmum* mutation", *Hue University Journal of Science*, **131(1A)**, pp.5-15 (in Vietnamese).

[14] A.R. Zuraida, K.H.F.L. Izzati1, O.A. Nazreena1, et al. (2013), "A simple and efficient protocol for the mass propagation of *Vanilla planifolia*", *American Journal of Plant Sciences*, **4(9)**, pp.1685-1692, DOI: 10.4236/ajps.2013.49205.