



# HOÀN THIÊN QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG *IN VITRO* LAN HỒ ĐIỆP (*Phalaenopsis* sp.) TRỒNG Ở THỪA THIÊN HUẾ

Nguyễn Đức Tuấn<sup>1</sup>\*, Phạm Thị Diễm Thi<sup>2</sup>, Lâm Thị Ngọc Thúy<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

<sup>2</sup> Viện công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tỉnh Lộ 10, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

\* Tác giả liên hệ: Nguyễn Đức Tuấn <ndt1122@gmail.com>

(Ngày nhận bài: 22-5-2021; Ngày chấp nhận đăng: 31-5-2021)

**Tóm tắt.** Phát hoa mang mầm ngủ của lan Hồ điệp (*Phalaenopsis* sp.) được sử dụng để làm vật liệu khởi đầu cho nhân giống *in vitro*. Khử trùng phát hoa với  $\text{HgCl}_2$  0,3% trong 20 phút cho tỷ lệ sống cao nhất (66,67%). Phát hoa cấy được chuyển sang môi trường MS bổ sung 0–4  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BAP. Môi trường tối ưu cho tái sinh chồi là môi trường MS bổ sung 4  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BAP cho 100% mẫu tái sinh chồi với tỷ lệ 4,22 chồi/mẫu. Kết quả nhân nhanh chồi cho thấy môi trường MS bổ sung 2,5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BAP kết hợp với 0,2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA là tốt nhất (6,33 chồi/mẫu), chiều cao chồi trung bình là 2,75 cm sau sáu tuần nuôi cấy. Chồi *in vitro* khỏe mạnh có 3–4 lá, cao 4–5 cm được chuyển sang môi trường MS bổ sung 1,5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA và 0,5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  than hoạt tính cho tỷ lệ tạo rễ đạt 100%, số rễ trung bình 4,33 rễ/chồi. Cây con thu được sau khi tạo rễ cao trung bình 5 cm được đưa ra trồng trên giá thể dớn trắng, tưới phun nano bạc nồng độ 6  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  thời gian 7 ngày/lần cho tỉ lệ sống và tốc độ sinh trưởng tốt nhất sau 8 tuần trồng.

**Từ khóa:** lan Hồ điệp, *Phalaenopsis* sp., nhân giống *in vitro*, nhân nhanh chồi, tạo rễ

## *In vitro* propagation of *Phalaenopsis* sp. in Thua Thien Hue

Nguyen Duc Tuan<sup>1</sup>\*, Pham Thi Diem Thi<sup>2</sup>, Lam Thi Ngoc Thuy<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue St., Hue, Vietnam

<sup>2</sup> Institute of Biotechnology, Hue University, Road No. 10, Phu Vang, Thua Thien Hue, Vietnam

**Abstract.** Flower stalk nodes of *Phalaenopsis* sp. were used as initial materials for *in vitro* propagation. The flower stalks sterilized with 0.3%  $\text{HgCl}_2$  for 20 min exhibit the highest survival rate (66.67%). Flower stalk nodes were transferred to the MS medium, supplemented with BAP (0–5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). The optimal medium for shoot regeneration is MS, supplemented with 4  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BAP; all shoots are regenerated. The average shoot per explant is 4.22. The shoot multiplication results show that the MS supplemented with 2.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BAP and 0.2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA is the best multiplication medium, providing 6.33 shoots per explant with an average shoot height of 2.75 cm. The healthy, 4–5 cm high shoots with 3–4 leaves were transferred to the MS medium, supplemented with 1.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA and 0.5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  activated charcoal. All shoots formed roots, and the

average number per shoot is 4.33. After rooting, the 5-cm high seedlings were grown on the sphagnum moss and sprayed with a 6 mg·L<sup>-1</sup> nanosilver solution every seven days. The best growth was observed after eight weeks.

**Keywords:** orchid, *Phalaenopsis* sp., *in vitro*, shoot multiplication, rooting

## 1 Đặt vấn đề

Lan Hồ điệp (*Phalaenopsis* sp.) là một trong những loài lan có giá trị kinh tế cao và được ưa chuộng nhất hiện nay. Hoa Hồ điệp có một nét đẹp vô cùng trang nhã và sang trọng nên được mệnh danh là hoàng hậu của các loài hoa lan. Có thể nói, Hồ điệp xuất hiện khắp mọi không gian khác nhau: trong nhà, ngoài vườn, trong văn phòng hay trên đường phố. Ngoài ra, trong hàng thập kỷ qua, các nhà lai tạo đã tạo ra được vô số các giống lai với hoa lớn, thời gian ra hoa kéo dài 2–3 tháng, màu sắc hoa cũng như các hoa văn trên hoa vô cùng đa dạng [1]. Cùng với sự phát triển của phương thức trồng trọt, Hồ điệp có thể được kích thích ra hoa chủ động quanh năm, đặc biệt là vào các dịp lễ, tết [2]. Nhờ vậy, người tiêu dùng có thể thưởng thức và chơi hoa dễ dàng hơn.

Hiện nay, nuôi cấy mô tế bào thực vật đang là phương pháp nhân giống chính được các nước trên thế giới ứng dụng để sản xuất cây giống lan Hồ điệp trên quy mô công nghiệp. Ưu điểm của phương pháp này là có thể tạo ra một số lượng lớn cây giống đồng đều về chất lượng trong một thời gian ngắn. Cây con được nuôi trong các bình nuôi cấy có thể được vận chuyển dễ dàng từ nước này sang nước khác làm cho Hồ điệp ngày càng phổ biến hơn [2]. Hơn nữa, chi phí sản xuất không cao nên có thể giúp giảm giá thành sản phẩm một cách đáng kể. Ở Việt Nam, đã có nhiều công trình nghiên cứu nhân giống *in vitro* lan Hồ điệp như của Đặng Văn Đông [3], Nguyễn Thị Pha [4] và Nguyễn Thị Sơn [5] nhân giống từ mầm ngủ phát hoa và Dương Tấn Nhựt tạo phôi vô tính [6]. Nhiều phòng thí nghiệm hay các công ty sản xuất thương mại đang dần phát triển công nghệ nuôi cấy mô Hồ điệp để cung cấp giống cho thị trường. Tuy vậy, công tác tạo cây giống cho thị trường vẫn còn nhiều vấn đề hạn chế như kỹ thuật vào mẫu chưa hoàn chỉnh làm cho cây giống không đạt yêu cầu, không chủ động được nguồn giống, chất lượng cây giống chưa đồng đều, lượng giống còn ít không đủ đáp ứng nhu cầu thị trường. Do đó, dù hiện nay thị trường hoa Hồ điệp trong nước vô cùng sôi động nhưng các giống hoa chủ yếu vẫn là nhập từ nước ngoài như Đài Loan và Thái Lan.

Xuất phát từ những lý do trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* lan Hồ điệp (*Phalaenopsis* sp.) nhằm tăng tỷ lệ thành công của kỹ thuật, làm cơ sở để triển khai sản xuất cây giống chất lượng cao cho thị trường trong khu vực và trên cả nước.

## 2 Vật liệu và phương pháp

### 2.1 Vật liệu

Vật liệu nuôi cấy khởi đầu của chúng tôi là phát hoa (chiều dài trung bình 30 cm) của cây lan Hồ điệp *Phalaenopsis* sp. (giống Hồ điệp bông lớn, phát hoa dài 40–50 cm, nhiều màu sắc chủ đạo như vàng hoàng kim, tím và trắng, nhập nội từ Thái Lan) thu thập từ các vườn lan trong thành phố Huế, tỉnh Thừa Thiên Huế.

Nano bạc dung dịch mẹ có nồng độ 200 ppm, kích thước hạt 40 nm được Khoa Vật lý Trường Đại học Khoa học, Đại Học Huế cung cấp.

### 2.2 Phương pháp

#### Khử trùng mẫu cấy

Phát hoa thu thập từ những cây khỏe mạnh được ngâm trong nước xà phòng loãng và rửa sạch dưới vòi nước chảy để loại bỏ bụi bẩn bên ngoài. Tiếp theo, chuyển phát hoa vào tủ cấy vô trùng, khử trùng sơ bộ bằng ethanol 70% và khử trùng phát hoa bằng  $\text{HgCl}_2$  0,3% trong các khoảng thời gian khác nhau rồi rửa lại bằng nước cất. Sau khi khử trùng, phát hoa được cắt thành từng đoạn dài 1,5–2 cm chứa các mầm ngủ và cấy lên môi trường nuôi cấy ban đầu là MS. Khả năng khử trùng của mẫu được đánh giá bằng cách theo dõi tỷ lệ mẫu chết, mẫu nhiễm và mẫu sạch (mẫu sống không nhiễm) sau bốn tuần.

#### Nuôi cấy khởi đầu

Mầm ngủ của phát hoa sạch được cấy lên môi trường MS [7] cơ bản có bổ sung  $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  agar,  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  saccharose và chất kích thích sinh trưởng (KTST) BAP ( $0\text{--}5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) để nuôi cấy khởi đầu. Chỉ tiêu đánh giá là tỷ lệ mẫu nhiễm, tỷ lệ mẫu sống và tỷ lệ mẫu nảy chồi. Số liệu nghiên cứu được thu sau sáu tuần nuôi cấy.

#### Nhân nhanh chồi

Các chồi kích thước 1,5–2 cm thu từ giai đoạn nuôi cấy khởi đầu được cấy trên môi trường dinh dưỡng cơ bản MS có bổ sung  $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  agar,  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  saccharose và bổ sung riêng lẻ các chất KTST BAP có nồng độ thay đổi  $0\text{--}3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  hoặc kết hợp BAP và  $0\text{--}1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA hay BAP kết hợp  $0\text{--}0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA để thăm dò khả năng nhân nhanh chồi. Khả năng nhân nhanh chồi được đánh giá bằng hệ số nhân chồi sau sáu tuần nuôi cấy.

#### Tạo rễ

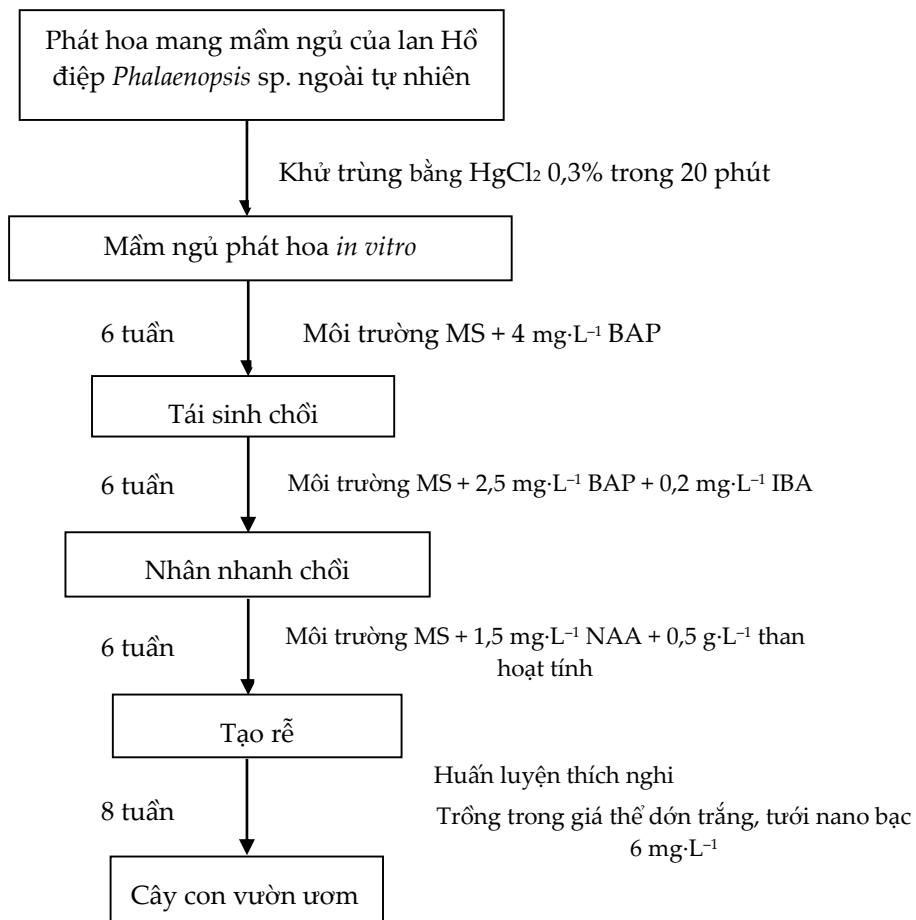
Các chồi hoàn chỉnh có 3–4 lá, kích thước 3–4 cm được tách riêng và cấy lên môi trường MS cơ bản có  $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  agar,  $30 \text{ g}$  saccharose,  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  than hoạt tính và bổ sung riêng lẻ NAA với

nồng độ thay đổi 0–2 mg·L<sup>-1</sup> để thăm dò khả năng hình thành và phát triển của rễ từ chồi *in vitro*. Số liệu nghiên cứu (số rễ/chồi, chiều dài rễ...) được thu sau sáu tuần nuôi cấy.

**Đưa cây ra vườn ươm**

Cây con *in vitro* tái sinh hoàn chỉnh được trồng vào giá thể dón trắng, tưới phun nano bạc nồng độ 2–8 mg·L<sup>-1</sup> lúc mới trồng và sau đó là bảy ngày/lần. Đánh giá khả năng sinh trưởng, phát triển của cây lan Hồ điệp sau tám tuần thông qua các chỉ tiêu tỉ lệ sống, số lá/cây và chiều dài trung bình của lá.

Toàn bộ quy trình nhân giống *in vitro* cây lan Hồ điệp *Phalaenopsis* sp. được trình bày trên Sơ đồ 1.



Sơ đồ 1. Quy trình nhân giống *in vitro* cây lan Hồ điệp *Phalaenopsis* sp. từ mầm ngủ phát hoa

### Điều kiện nuôi cấy

Các thí nghiệm nuôi cấy được tiến hành trong điều kiện nhân tạo với thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2000–3000 lux, nhiệt độ 25 °C.

### Phân tích số liệu

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi thí nghiệm được lặp lại ba lần, mỗi lần ít nhất 15 mẫu. Kết quả thí nghiệm được xử lý để thu giá trị trung bình và kiểm định Duncan bằng phần mềm SPSS 20.0 với mức ý nghĩa  $p < 0,05$ .

## 3 Kết quả và thảo luận

### 3.1 Ảnh hưởng của thời gian xử lý HgCl<sub>2</sub> 0,3% đến kết quả khử trùng

Quan sát đoạn phát hoa mang mầm ngủ sau bốn tuần nuôi cấy trên môi trường MS cơ bản, chúng tôi nhận thấy rằng, thời gian khử trùng bằng HgCl<sub>2</sub> 0,3% ở các khoảng thời gian khác nhau có ảnh hưởng lớn đến mẫu nuôi cấy (Bảng 1). Ở thời gian 10 phút, tỉ lệ mẫu nhiễm là rất cao (93,33%) do hóa chất vẫn chưa thấm vào sâu để làm sạch các mô cơ quan bên trong. Khi tăng thời gian khử trùng lên 10–20 phút, tỷ lệ nhiễm giảm nhanh chóng. Tuy nhiên, nếu kéo dài thời gian khử trùng thì tỷ lệ mẫu chết cũng tăng lên đáng kể. Kết quả tốt nhất thu được ở thời gian khử trùng là 20 phút cho tỷ lệ mẫu sống đạt 66,67%. Kết quả chúng tôi thu được khác với kết quả khử trùng phát hoa của Đặng Văn Đông khi nghiên cứu nhân giống và sản xuất một số giống hoa lan Hồ Điệp theo quy mô công nghiệp với thời gian khử trùng là 10 phút bằng HgCl<sub>2</sub> 0,2% cho tỷ lệ mẫu sạch là 76,67% [3]. Điều này có thể là do nguồn mẫu ban đầu khác nhau về độ tuổi và độ sạch.

### 3.2 Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tạo chồi từ mầm ngủ phát hoa

Sau khi thu được các mẫu vô trùng, chúng tôi tiến hành chuyển sang môi trường có bổ sung BAP ở các nồng độ khác nhau để kích thích tạo chồi. Sau sáu tuần nuôi cấy, kết quả thu được cho thấy BAP có ảnh hưởng đến khả năng tạo chồi từ mầm ngủ lan Hồ điệp (Bảng 2).

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của thời gian khử trùng phát hoa lan Hồ điệp bằng dung dịch HgCl<sub>2</sub> 0,3%

Thời gian xử lý (phút)	Tỉ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỉ lệ mẫu chết (%)	Tỉ lệ mẫu sống (%)
10	93,33	0,00	6,67
15	82,22	0,00	17,78
<b>20</b>	<b>28,89</b>	<b>4,44</b>	<b>66,67</b>
25	24,44	31,11	44,44

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tạo chồi của mầm ngủ phát hoa sau sáu tuần nuôi cấy

Nồng độ BAP (mg·L <sup>-1</sup> )	Tỉ lệ mất ngủ tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu
0	72,22	1,00 <sup>d</sup>
2	88,89	1,94 <sup>c</sup>
3	100	2,50 <sup>b</sup>
4	100	3,22 <sup>a</sup>
5	100	2,16 <sup>bc</sup>

*Chú thích:* Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với  $p < 0,05$  theo kiểm định Duncan.

Môi trường bổ sung BAP cho tỉ lệ mẫu tạo chồi và số chồi/mẫu cao hơn nhiều so với môi trường không bổ sung BAP. Nồng độ BAP khác nhau có ảnh hưởng khác nhau đến khả năng tạo chồi. Khi tăng nồng độ BAP 2–5 mg·L<sup>-1</sup> thì tỷ lệ nảy chồi tăng 88,9–100%. Kết quả tạo chồi tốt nhất thu được ở môi trường bổ sung 4 mg·L<sup>-1</sup> BAP cho tỷ lệ mất ngủ tạo chồi là 100%, số chồi đạt 2,7 chồi/mẫu (Hình 1A).

Quy trình nhân giống trực tiếp lan Hồ điệp *Phalaenopsis* sp. từ mầm ngủ phát hoa của Nguyễn Thị Pha cho thấy môi trường có nồng độ khoáng thấp (1/2 MS đa lượng + 1/2 MS vi lượng) bổ sung 2 mg·L<sup>-1</sup> BAP và 0,5 mg·L<sup>-1</sup> NAA là môi trường tốt nhất cho sự tạo chồi từ mầm ngủ phát hoa với 2,83 chồi/mẫu sau 60 ngày nuôi cấy [6]. Nguyễn Thị Sơn và cs. khi nghiên cứu tạo chồi từ mầm ngủ phát hoa cây lan Hồ điệp (*Phalaenopsis Sogo Yukidian*) trên môi trường cơ bản MS bổ sung 2 mg·L<sup>-1</sup> BAP cho kết quả tạo chồi với tỉ lệ 90% sau sáu tuần nuôi cấy [4].

### 3.3 Ảnh hưởng của các chất KTST đến khả năng nhân nhanh chồi *in vitro*

#### Ảnh hưởng của BAP

Để nghiên cứu ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân nhanh, các chồi với kích thước 1,5–2 cm được cấy lên môi trường cơ bản MS có bổ sung với các nồng độ khác nhau. Sau sáu tuần nuôi cấy, kết quả thu được ở Bảng 3 cho thấy BAP có ảnh hưởng đến khả năng nhân nhanh của chồi lan *in vitro*. Khả năng nhân chồi tỉ lệ thuận với nồng độ BAP khi tăng nồng độ 1,5–2,5 mg·L<sup>-1</sup> với số chồi/mẫu tăng từ 2,11 đến 4,61. Khi tiếp tục tăng BAP thì khả năng nhân chồi giảm. Kết quả nhân chồi tốt nhất thu được ở môi trường bổ sung 2,5 mg·L<sup>-1</sup> BAP cho hệ số đạt 3,72 chồi/mẫu và chiều cao chồi trung bình là 3,02 cm. Ở môi trường cơ bản MS không bổ sung KTST, các chồi *in vitro* chỉ phát triển và kéo dài chứ không tạo chồi mới.

Nguyễn Thị Sơn và cs., khi nghiên cứu nhân giống vô tính cây lan Hồ điệp *Phalaenopsis yukidian* bằng phát hoa, cho thấy môi trường MS bổ sung 10% nước dừa và 3 mg·L<sup>-1</sup> BA là môi trường tối ưu để nhân nhanh chồi lan với hệ số nhân chồi cao nhất là 4,2 lần sau sáu tuần nuôi cấy [5].

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân nhanh từ chồi *in vitro* sau sáu tuần nuôi cấy

Nồng độ BAP (mg·L <sup>-1</sup> )	Hệ số nhân chồi	Chiều cao chồi (cm)
0,0	1,00 <sup>d</sup>	1,84 <sup>c</sup>
1,5	2,11 <sup>c</sup>	2,84 <sup>b</sup>
2,0	2,83 <sup>bc</sup>	<b>3,56<sup>a</sup></b>
<b>2,5</b>	<b>4,61<sup>a</sup></b>	<b>3,02<sup>ab</sup></b>
3,0	3,44 <sup>b</sup>	2,42 <sup>bc</sup>

*Chú thích:* Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với  $p < 0,05$  theo kiểm định Duncan.

### Ảnh hưởng của BAP kết hợp với NAA

Sau khi tìm được nồng độ BAP tốt nhất cho quá trình nhân chồi, chúng tôi sử dụng kết quả trên cho các thí nghiệm tiếp theo. BAP với nồng độ 2,5 mg·L<sup>-1</sup> được kết hợp với NAA ở các nồng độ 0,3–1 mg·L<sup>-1</sup> để khảo sát khả năng nhân chồi. Kết quả ở Bảng 4 cho thấy môi trường bổ sung BAP và NAA có ảnh hưởng tích cực hơn đến sự nhân nhanh chồi *in vitro* của lan Hồ điệp so với môi trường chỉ bổ sung BAP. Kết quả nhân chồi tốt nhất thu được ở môi trường bổ sung 2,5 mg·L<sup>-1</sup> BAP và 0,5 mg·L<sup>-1</sup> NAA với số chồi thu được là 5,83 chồi/mẫu, chiều cao chồi trung bình là 3,25 cm.

Balilashaki, khi nuôi cấy giống *Phalaenopsis amabilis* cv. Cool 'Breeze' từ mầm ngủ phát hoa, cho thấy môi trường nhân chồi tối ưu là MS bổ sung 4,4 mg·L<sup>-1</sup> BA và 1,0 mg·L<sup>-1</sup> NAA với số chồi/mẫu cao nhất (5,3 chồi) [8].

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của BAP 2,5 mg·L<sup>-1</sup> kết hợp với NAA đến khả năng nhân nhanh từ chồi *in vitro* sau sáu tuần nuôi cấy

Nồng độ NAA (mg·L <sup>-1</sup> )	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
0,0	4,61 <sup>b</sup>	3,02 <sup>ab</sup>
0,3	4,72 <sup>b</sup>	3,73 <sup>a</sup>
<b>0,5</b>	<b>5,83<sup>a</sup></b>	<b>3,25<sup>ab</sup></b>
0,7	4,17 <sup>bc</sup>	2,93 <sup>b</sup>
1,0	3,11 <sup>c</sup>	1,91 <sup>c</sup>

*Chú thích:* Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với  $p < 0,05$  theo kiểm định Duncan.

### Ảnh hưởng của BAP kết hợp với IBA

Chúng tôi tiếp tục sử dụng nồng độ 2,5 mg·L<sup>-1</sup> BAP kết hợp với IBA (0–0,5 mg·L<sup>-1</sup>) để nghiên cứu khả năng nhân nhanh chồi Hồ điệp. Kết quả ở Bảng 5 cho thấy IBA kết hợp với BAP

**Bảng 5.** Ảnh hưởng của BAP 2,5 mg·L<sup>-1</sup> kết hợp với IBA đến khả năng nhân nhanh từ chồi *in vitro* sau sáu tuần nuôi cấy

Nồng độ IBA (mg·L <sup>-1</sup> )	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
0,0	4,61 <sup>b</sup>	3,02 <sup>a</sup>
0,1	5,25 <sup>b</sup>	2,84 <sup>ab</sup>
<b>0,2</b>	<b>6,33<sup>a</sup></b>	<b>2,75<sup>ab</sup></b>
0,3	5,18 <sup>b</sup>	3,22 <sup>a</sup>
0,5	3,17 <sup>c</sup>	2,03 <sup>ab</sup>

*Chú thích:* Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với  $p < 0,05$  theo kiểm định Duncan.

có ảnh hưởng tốt đến khả năng nhân nhanh chồi. Kết quả tốt nhất là 6,3 chồi/mẫu ở môi trường bổ sung 2,5 mg·L<sup>-1</sup> BAP kết hợp với 0,2 mg·L<sup>-1</sup> IBA (Hình 1B). Khi tiếp tục tăng nồng độ IBA, số chồi tạo thành giảm dần.

### 3.4 Ảnh hưởng của NAA đến khả năng tạo rễ của chồi *in vitro*

Các chồi *in vitro* khỏe mạnh có 3–4 lá, cao 4–5 cm được tách riêng và chuyển vào môi trường MS cơ bản có bổ sung 1 mg·L<sup>-1</sup> than hoạt tính và NAA nồng độ thay đổi 0–2 mg·L<sup>-1</sup> để khảo sát khả năng hình thành và phát triển rễ. Kết quả sau sáu tuần nuôi cấy được trình bày ở Bảng 6 cho thấy NAA có ảnh hưởng đến khả năng hình thành và phát triển rễ lan Hồ điệp. Khi tăng nồng độ NAA 0,5–2 mg·L<sup>-1</sup> thì tỉ lệ chồi tạo rễ tăng mạnh từ 86,7–100%. Môi trường bổ sung 1,5 mg·L<sup>-1</sup> NAA cho khả năng tạo rễ tốt nhất với số rễ trung bình/chồi là 4,33; chiều dài trung bình đạt 3,46 cm; rễ hình thành và phát triển bình thường (Hình 1C).

Theo Nguyễn Thị Sơn, môi trường cơ bản MS bổ sung 0,5 g·L<sup>-1</sup> than hoạt tính là môi trường tối ưu cho sự tạo rễ [5]. Tuy nhiên, ở nghiên cứu của chúng tôi, môi trường chỉ có 0,5 g·L<sup>-1</sup> than hoạt tính mà không bổ sung NAA cho khả năng tạo rễ chậm; chỉ 40% số chồi tạo rễ với số rễ

**Bảng 6.** Ảnh hưởng của NAA đến khả năng tạo rễ sau sáu tuần nuôi cấy

Nồng độ NAA (mg·L <sup>-1</sup> )	Tỉ lệ chồi tạo rễ (%)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)
0,0	40,0	1,67 <sup>d</sup>	1,32 <sup>c</sup>
0,5	86,7	2,60 <sup>bc</sup>	2,40 <sup>b</sup>
1,0	100	3,25 <sup>b</sup>	2,77 <sup>ab</sup>
<b>1,5</b>	<b>100</b>	<b>4,33<sup>a</sup></b>	<b>3,46<sup>a</sup></b>
2,0	100	2,08 <sup>cd</sup>	2,05 <sup>bc</sup>

*Chú thích:* Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với  $p < 0,05$  theo kiểm định Duncan.

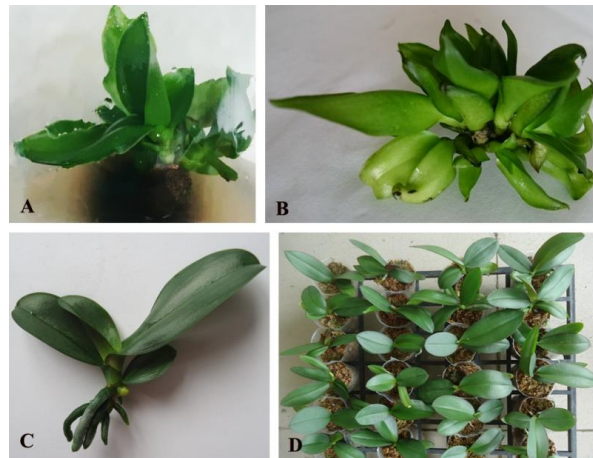


trung bình là 1,7 sau sáu tuần. Than hoạt tính chỉ có tác dụng làm cho cây sinh trưởng khỏe mạnh, giúp cho cây có thể sống tốt khi đưa ra trồng ở bên ngoài.

### 3.5 Trồng và chăm sóc cây con

Các túi nuôi cấy chứa cây con *in vitro* có 3–4 lá, chiều cao từ 4–6 cm và có 3–6 rễ được đưa ra khỏi phòng nuôi trong khoảng 5–7 ngày, sau đó mở miệng túi trong 2 ngày để cây thích nghi dần với điều kiện bên ngoài. Cây con được trồng vào giá thể dón trắng, tưới ẩm gốc khi giá thể bắt đầu khô trên bề mặt, định kỳ bảy ngày tưới dung dịch nano bạc nồng độ 2, 4, 6, 8 mg·L<sup>-1</sup> lên lá và gốc. Sau tám tuần trồng và theo dõi, chúng tôi nhận thấy nano bạc có ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây lan con *in vivo* (Bảng 7). Đối với thí nghiệm không tưới bằng nano bạc, tỉ lệ sống của cây sau tám tuần là 82,2%, số lá/cây là 4,1 và chiều dài trung bình của lá là 5,3 cm. Tưới nano bạc trong quá trình trồng làm tăng tỉ lệ sống của cây so với đối chứng, đạt 86,7–97,8%; khả năng sinh trưởng của cây cũng tăng rõ rệt. Trong các công thức xử lý thì nano bạc 6 mg·L<sup>-1</sup> là thích hợp nhất, với tỉ lệ sống của cây con đạt 97,8%, số lá/cây là 5,8 và chiều dài lá trung bình là 9,6 cm (Hình 1D). Tiếp tục tăng nồng độ nano bạc xử lý thì tỉ lệ sống và khả năng sinh trưởng của cây giảm. Điều này có thể do nồng độ nano bạc quá cao sẽ gây độc và ức chế sự sinh trưởng của thực vật.

Tác động của nano bạc lên sự sinh trưởng của cây con *in vitro* và *in vivo* đã được chứng minh. Nano bạc có đặc tính kháng nấm và kháng khuẩn cao nên được sử dụng nhiều trong nuôi cấy mô để khử trùng mẫu cấy [9, 10]. Nano bạc còn có khả năng tăng cường sinh trưởng, phát triển và tạo rễ của cây hoa hồng *in vitro* [11]; tăng tỉ lệ sống và các chỉ tiêu tăng trưởng của cây Cúc vi thủy canh sau khi chuyển ra vườn ươm [12]. Trong thí nghiệm của chúng tôi, nano bạc có tác động bảo vệ cây con *in vitro* khỏi sự xâm nhập của các vi sinh vật gây hại khi mới đưa ra trồng bên ngoài và kích thích sự sinh trưởng của cây con trong quá trình trồng.



**Hình 1.** **A:** Chồi tái sinh từ mầm ngủ phát hoa trên môi trường MS bổ sung  $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BAP sau sáu tuần nuôi cấy; **B:** Cụm chồi *in vitro* hình thành trên môi trường MS bổ sung  $2,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BAP +  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA sau sáu tuần nuôi cấy; **C:** Rễ hình thành trên môi trường MS bổ sung  $1,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA +  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  than hoạt tính sau sáu tuần nuôi cấy; **D:** Cây con sinh trưởng trên giá thể dớn trắng, tưới nano bạc  $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  sau tám tuần trồng

**Bảng 7.** Ảnh hưởng của nano bạc đến tỉ lệ sống và sinh trưởng của cây con

Nồng độ nano bạc ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Tỉ lệ sống (%)	Số lá/Cây	Chiều dài lá (cm)
0	82,2	4,12 <sup>c</sup>	5,34
2	88,9	4,34 <sup>c</sup>	7,17
4	93,3	4,91 <sup>b</sup>	8,63
6	97,8	5,87 <sup>a</sup>	9,66
8	86,7	4,52 <sup>bc</sup>	6,51

*Chú thích:* Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với  $p < 0,05$  theo kiểm định Duncan.

#### 4 Kết luận

Phát hoa lan Hồ điệp khử trùng với  $\text{HgCl}_2$  0,3% trong 20 phút cho tỷ lệ sống cao nhất, đạt 66,67%. Môi trường MS bổ sung  $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BAP cho 100% mầm ngủ phát hoa tạo chồi với tỷ lệ 4,22 chồi/mẫu. Kết quả nhân nhanh chồi tốt nhất thu được trên môi trường MS bổ sung  $2,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BAP kết hợp  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA cho hệ số nhân chồi đạt 6,33 chồi/mẫu; chiều cao chồi trung bình đạt 2,75 cm. Môi trường tạo rễ tối ưu là MS bổ sung  $1,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA và  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  than hoạt tính cho tỷ lệ tạo rễ đạt 100%; số rễ/chồi là 4,33 và chiều dài rễ trung bình là 3,46 cm. Sau tám tuần trồng cây con trên giá thể dớn trắng, tỷ lệ sống và tốc độ sinh trưởng tốt nhất ở công thức phun bạc  $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , bảy ngày phun một lần.

### Tài liệu tham khảo

1. Runkle E., Wang Y. T., Blanchard M. G., Lopez R. G. (2007), *Growing the Best Phalaenopsis, Part 1: An Introduction to Potted Phalaenopsis Orchids, Orchids*, 76(1), 24–29.
2. Thạch N. Q, Anh N. T. L, Hải N. T. L (2005), *Lan Hồ điệp (Phalaenopsis) kỹ thuật chọn tạo, nhân giống và nuôi trồng*, Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
3. Nhật D. T, Trâm H. N, Huy N. P, Khiêm Đ. V (2009), Ảnh hưởng của nước dừa và sucroza lên sự tăng sinh mô sẹo và sự hình thành phôi vô tính ở loài lan Hồ điệp (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume), *Tạp chí Sinh học*, 31(1), 77–84.
4. Sơn N. T, Thạch N. Q, Anh N. T. L, Nga H. T, Nguyệt H. T. A (2014), Nhân dòng vô tính cây lan Hồ Điệp *Phalaenopsis yuki-dian* (Hồ Điệp hoa trắng nhị vàng), *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 12, 1283–1293.
5. Tùng H. T, Nguyễn Phúc Huy, Nam N. B, Luận V. Q, Hiền V. T, Phương T. T. B, Nhật D. T (2016), Tác động của nano bạc lên khả năng tăng trưởng của cây cúc trong hệ thống vi thủy canh, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 14(3), 461–471.
6. Đông Đ. V (2011), *Hoàn thiện quy trình nhân giống và sản xuất một số giống hoa lan Hồ Điệp theo quy mô công nghiệp*, Báo cáo tổng hợp kết quả Khoa học Công nghệ dự án.
7. Phương B. T. T, Lan N. P, Trang Đ. T. K, Trâm T. B, Minh P. X. B (2020), Ảnh hưởng của nano bạc đến khả năng nhân giống *in vitro* cây Trầu tiên (*Asarum glabrum* Merr.), *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 62(6), 19–23.
8. Balilashaki K., Naderi R., Kalantari S., Soorni A. (2014), Micropropagation of *Phalaenopsis amabilis* cv. Cool 'Breeze' with using of flower stalk nodes and leaves of sterile obtained from node cultures, *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 3(7), 823–829.
9. Cường Đ. M, Phương T. T. B, Nhật D. T (2018), Ảnh hưởng của nano bạc lên khả năng cảm ứng mô sẹo và tái sinh chồi từ mẫu lá cây dâu tây (*Fragaria x ananassa*) nuôi cấy *in vitro*, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*, 127(1C), 61–70.
10. Nhật D. T, Tuấn N. X, Anh N. T. T, Long H. V, Tùng H. T, Nam N. B và cs. (2015), Nghiên cứu ảnh hưởng của nano bạc lên sự nhân chồi, sinh trưởng và phát triển của cây hoa hồng (*Rosa* sp.) *in vitro*, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 13(2), 231–239.
11. Murashige T., Skoog F. (1962), A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures, *Physiol Plant*, 15, 473–497.
12. Pha N. T, Mai T. T. X, Trang L. T. M, Liên N. T (2011), Nuôi cấy mầm ngủ phát hoa lan Hồ Điệp (*Phalaenopsis* sp.), *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, 20b, 12–20.