

NHÂN GIỐNG LAN GIẢ HẠC (*Dendrobium anosmum*) ĐỘT BIẾN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY *IN VITRO*

Lê Thiên Vinh¹, Trương Thị Ly Na¹, Nguyễn Thị Bích Thu¹, Nguyễn Thị Diễm²,
Nguyễn Thị Oanh², Nguyễn Thị Kim Cúc^{2*}

¹Trường Cao đẳng kỹ thuật Quảng Trị, 179, Lý Thường Kiệt, TP Đông Hà, Quảng Trị, Việt Nam
²Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tinh lộ 10, Phú Thượng, TP Huế, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Nguyễn Thị Kim Cúc <ntkcuc@hueuni.edu.vn>
(Ngày nhận bài: 14-10-2021; Ngày chấp nhận đăng: 27-12-2021)

Tóm tắt. Hiện nay, hoa lan đột biến đang trở thành tâm điểm được nhiều người quan tâm sưu tầm, nhưng do giá thành cây giống quá cao nên rất ít người có thể sở hữu. Để tạo ra giống với số lượng lớn, rẻ thì việc nhân giống *in vitro* những giống lan này là cần thiết. Vì vậy, từ vật liệu khởi đầu là quả lan sáu tháng tuổi tự thụ phấn từ cây mẹ đột biến, chúng tôi đã xây dựng thành công quy trình nhân giống lan Giả hạc đột biến bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*. Kết quả cho thấy môi trường thích hợp cho hạt lan đột biến nảy mầm tạo protocorm là môi trường MS cơ bản, bổ sung 0,5 mg/L N⁶-benzyladenine (BA) với tỷ lệ 93%. Môi trường thích hợp để protocorm tạo chồi là MS cơ bản, bổ sung 1,0 mg/L BA và 0,5 mg/L indole 3-butyric acid (IBA) với tỷ lệ tạo chồi 88%, chiều cao và số lá trên chồi trung bình 1,42 cm và 2,4 lá. Môi trường tối ưu để chồi tạo cây hoàn chỉnh là môi trường MS cơ bản, bổ sung 1,0 mg/L naphthaleneacetic acid (NAA) với tỷ lệ 99,06% chồi ra rễ; chiều dài rễ đạt 5,34 cm với trung bình 8,53 rễ/chồi. Tỷ lệ sống của cây con *in vitro* đột biến sau 60 ngày ra vườn ươm là 84,9% trên giá thể xơ dừa và trấu hun (1:1).

Từ khóa: *Dendrobium anosmum*, Giả hạc đột biến, gieo hạt, *in vitro*

In vitro propagation of *Dendrobium anosmum* mutation

Le Thiên Vinh¹, Trương Thị Ly Na¹, Nguyễn Thị Bích Thu¹, Nguyễn Thị Diễm²,
Nguyễn Thị Oanh², Nguyễn Thị Kim Cúc^{2*}

¹Quang Tri Technical College, 179, Ly Thuong Kiet, Dong Ha City, Quang Tri, Vietnam
²Institute of Biotechnology, Hue University, Provincial Road 10, Phu Thuong, Hue City, Thua Thien Hue, Vietnam

* Correspondence to Nguyen Thi Kim Cuc <ntkcuc@hueuni.edu.vn>
(Received: 14 October 2021; Accepted: 27 December 2021)

Abstract. Currently, mutant orchids are very interested in orchid lovers who want to collect, but the price of mutant orchids is costly leading to many orchid lovers are unable to own it. This study aims to create mutant orchid plantlets with high quantity and low cost via *in vitro* propagation method. From the self-pollinated six months old seedpods, we have successfully propagated the orchid mutant seedlings. The results showed that the suitable medium for mutant orchid seed germination and creating protocorm was the basic MS medium supplemented with 0.5 mg/L BA with a rate of up to 93%. The medium for shoot formation and shoot development from protocorm was the best on MS medium added

with 1.0 mg/L BA and 0.5 mg/L IBA with a rate of 88%. The rooting induction was 99.06% and the root length reached 5.34 cm with an average of 8.53 roots/shoot when shoots cultured on MS medium supplemented with 1.0 mg/L NAA. The survival rate of *in vitro* *Dendrobium anosmum* mutant seedlings after 60 days in the nursery stage was 84.9% on coir and rice husks substrates (1:1).

Keywords: *Dendrobium anosmum*, *in vitro*, mutant orchids, seedings

1 Mở đầu

Lan Giả hạc hay còn gọi là lan Phi Điệp có tên khoa học là *Dendrobium anosmum*, thuộc chi *Dendrobium*, họ *Orchidaceae* [1, 2]. Lan Giả hạc có hình thái, màu sắc và kích thước đa dạng nên được đánh giá là một trong những loài hoa, cây cảnh có giá trị trên thế giới [2, 3]. Hiện nay, bên cạnh những giống lan Giả hạc tự nhiên, đã có một số giống đột biến với hình thái hoa đặc biệt và khác lạ so với giống thuần chủng và đang được nhiều người quan tâm. Ngoài ra, cây lan có đặc điểm là tỷ lệ nảy mầm của hạt thấp (<5%) [4, 5] và hệ số nhân giống hàng năm dựa trên thân cây mẹ rất hạn chế nên giá thành của những giống lan đột biến đang cao gấp nhiều lần so với giống rừng tự nhiên. Vì vậy, việc tìm ra phương pháp nhân giống mới để tạo ra số lượng lớn những giống lan đột biến đẹp với giá thành hợp lý là vấn đề cần được thực hiện.

Hiện nay, nhiều nhà nghiên cứu đã nhân giống *in vitro* để bảo tồn các giống hoa lan trên thế giới cũng như ở Việt Nam [6-11]. Việc sử dụng môi trường MS (Murashige-Skoog, 1962) [12] với các chất dinh dưỡng tự nhiên (nước dừa, khoai tây, chuối) và các chất điều hoà sinh trưởng như N⁶-benzyladenine (BA), kinetin (KIN), indole 3-butyric acid (IBA) và naphthaleneacetic acid (NAA) để nhân giống *in vitro* hoa lan đã có nhiều thành tựu đáng kể. Pant và Thapa trong nhân giống *in vitro* *D. primulium* Lindl. bằng đỉnh ngọn đã nhân được 4,5 chồi bên trên một mẫu chồi khi nuôi cấy trên môi trường MS, bổ sung 3% đường, 0,8% agar và 1,5 mg/L BA sau năm tuần [7]. Chồi tạo rễ tốt trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L IBA hoặc 1,5 mg/L IAA với 3,5 rễ trên chồi. Lan và Anh đã nhân giống lan Thạch hộc (*Dendrobium nobile*

Lindl.) từ quả lan năm tháng tuổi thành công trên môi trường MS bổ sung 10% nước dừa, 1% đường và 0,6% agar [9]. Hiền và Đính đã nhân giống *in vitro* lan Đại châu đỏ (*Rhynchostylis gigantea* L.) từ hạt lan chín tháng tuổi đạt 84,62% hạt nảy mầm trên môi trường MS bổ sung 2,0 mg/L BAP và 1,0 mg/L IBA [13]. Chiến và cộng sự nhân giống lan Mokara (từ protocorm) bằng nuôi cấy mô phân sinh lá và cho thấy môi trường MS bổ sung 2,0 mg/L BA thích hợp cho mô sẹo tạo cụm chồi và môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L NAA là tốt nhất cho chồi tạo rễ [14]. Tương tự, Duyên đã nhân giống lan Giả hạc (*Dendrobium anosmum*) từ hạt với tỷ lệ nảy mầm 85% trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L BA và 0,2 mg/L NAA [15].

Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu trong nhân giống, phát triển và bảo tồn hoa lan, nhưng chưa có nghiên cứu nào trên giống lan đột biến được công bố. Do đó, trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả nhân giống lan đột biến bằng phương pháp gieo hạt *in vitro* thông qua các nghiên cứu so sánh đánh giá khả năng sinh trưởng, phát triển giữa hạt lan rừng tự nhiên và hạt lan đột biến.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Hai quả lan Giả hạc sáu tháng tuổi thu thập từ hai vị trí khác nhau ở rừng Quảng Trị bao gồm quả lan rừng Giả hạc tự nhiên (TN) thu tại xã Tà Long thuộc huyện Dakrông và quả lan Giả hạc đột biến (ĐB) thu tại xã Hương Sơn thuộc huyện Hương Hóa.

2.2 Thời gian và địa điểm

Nghiên cứu được thực hiện tại phòng thí nghiệm nuôi cấy mô tế bào của Trường Cao đẳng Kỹ thuật Quảng Trị từ tháng 11/2020 đến tháng 8/2021.

2.3 Phương pháp

Các thí nghiệm được tiến hành trong phòng nuôi cấy vô trùng ở 25 ± 2 °C với cường độ ánh sáng 1.000–2.000 lux và thời gian chiếu sáng 8 giờ/ngày. Lan được nuôi cấy trong chai thủy tinh với đường kính đáy 6 cm và chiều cao 11,5 cm. Môi trường nuôi cấy là môi trường MS cơ bản (thành phần dinh dưỡng khoáng và vitamin đầy đủ theo Murashige-Skoog, 1962 [12]) hoặc ½ MS cơ bản (½ thành phần dinh dưỡng khoáng và vitamin theo Murashige-Skoog, 1962 [12]) bổ sung 10% nước dừa + 3% sucrose + 0,05% than hoạt tính + 0,7% agar và hoặc không bổ sung chất kích thích sinh trưởng. Môi trường nuôi cấy được chuẩn đến pH 5,8 và rót vào chai với thể tích 30 ml/chai trước khi hấp khử trùng ở 121 °C, 1 atm trong 15 phút.

Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy và BA đến khả năng nảy mầm và tạo protocorm của hạt

Mẫu quả lan sau khi thu thập được đưa về phòng thí nghiệm và tiến hành khử trùng. Đầu tiên, quả được rửa sạch bề mặt bằng bông gòn và xà phòng lifebuoy dưới vòi nước chảy. Sau đó, quả được lặt nhẹ trong nước cất vô trùng trong 1–2 phút trước khi đưa vào thực hiện các thao tác trong tủ cấy vô trùng. Ở đây, quả được rửa lại một lần nữa với nước cất vô trùng trước khi quả được nhúng trong cồn 96% và lặt đều trong 20 giây. Quả sau đó được lấy ra và đốt qua trên ngọn lửa đèn cồn.

Sau khi khử trùng, quả được đặt vào đĩa Petri để tiến hành tách lấy hạt. Hạt được cấy lên hai loại môi trường MS và ½ MS bổ sung BA với nồng độ 0–2 mg/L để đánh giá khả năng nảy mầm tạo protocorm của hạt lan. Hạt được cấy rải đều trên

bề mặt môi trường khoảng 0,01 g trên mỗi chai. Khối lượng hạt được xác định bằng cân phân tích KERN ABS 220-4N. Mỗi công thức thí nghiệm được tiến hành trong 10 chai thủy tinh và lặp lại ba lần. Mẫu được nuôi cấy trong sáu tuần. Các chỉ tiêu theo dõi của hai mẫu bao gồm tỉ lệ bình nhiễm, tỉ lệ mẫu phát sinh protocorm và lựa chọn môi trường thích hợp để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của BA và IBA đến khả năng tạo chồi và phát triển chồi từ protocorm

Protocorm sau khi hình thành được cấy chuyển sang môi trường MS cơ bản bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng BA với nồng độ 0,5–2,5 mg/L và IBA với nồng độ 0 hoặc 0,5 mg/L để thăm dò khả năng hình thành chồi từ protocorm. Mỗi công thức thí nghiệm được tiến hành trong 10 chai thủy tinh và lặp lại ba lần, mỗi chai 20 mẫu protocorm. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm: tỉ lệ tạo chồi, chiều cao chồi và số lá/chồi được quan sát sau sáu tuần nuôi cấy. Từ đó, lựa chọn công thức tốt nhất cho phát triển chồi.

Ảnh hưởng của IBA và NAA đến khả năng ra rễ

Khi đạt chiều cao từ 2,5 đến 3,0 cm, chồi được cấy chuyển qua môi trường MS cơ bản bổ sung IBA hoặc NAA với nồng độ 0–2 mg/L để thăm dò khả năng ra rễ sau tám tuần nuôi cấy. Các chỉ tiêu theo dõi gồm: tỷ lệ chồi ra rễ, số rễ và chiều dài rễ.

Đưa cây ra vườn ươm

Sau khi tạo cây hoàn chỉnh, cây con được huấn luyện làm quen dần với môi trường nhiệt độ phòng có ánh sáng tán xạ trong vòng hai tuần trước khi được đưa ra vườn ươm. Cây con *in vitro* được rửa sạch để loại bỏ hết môi trường dinh dưỡng thạch bám vào rễ trước khi trồng. Sau đó, cây được trồng vào cốc chuyên dụng trồng lan chứa giá thể. Lan được trồng theo phương pháp của Diễm: giá thể sử dụng là xơ dừa và trấu hun (tỷ lệ 1:1) [16],

kết hợp phun phòng bệnh bằng chế phẩm sinh học Olicide 9DD định kỳ 10 ngày một lần.

Vườn ươm có nhiệt độ 18–35 °C, có lắp đặt lưới lan để giảm ánh sáng trực tiếp từ mặt trời và hệ thống phun sương, có gió thông thoáng, khô ráo, không đọng nước, vườn có mái che nilon trắng để tránh nước mưa trực tiếp vào cây con và không sử dụng hệ thống điều hoà nhiệt độ [16].

Nước tưới được áp dụng như nhau giữa các công thức. Khi thời tiết trên 35 °C, cây con được tưới đủ ẩm hai lần/ngày; 25–34 °C một lần/ngày và <25 °C, cây được quan sát và tưới nước 2–3 ngày một lần.

Cây ra vườn được đánh giá tỷ lệ sống, tỷ lệ bệnh, tỷ lệ cây ra lá mới sau 15 ngày một lần, liên tiếp 60 ngày sau khi chuyển cây ra vườn. Mỗi mẫu giống có 30 cây với ba lần lặp lại.

Xử lý số liệu

Kết quả thí nghiệm được xử lý tính trung bình bằng phần mềm Excel và phân tích ANOVA với kiểm định Tukey ($p < 0,05$) bằng phần mềm SPSS 20.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Hình thái mẫu hoa lan Giả hạc

Hoa được mô tả dựa theo De và cs. [17]. Hoa lan Giả hạc thu thập tại Quảng Trị có màu sắc và đặc điểm riêng so với các giống ở vùng miền khác. Hình 1a cho thấy hoa Giả hạc rừng TN thu thập từ Tà Long có đường kính trung bình 3–6 cm, có năm cánh bao gồm một cánh đài trên, hai cánh đài dưới và hai cánh vai. Có môi hoa, hai mắt hoa, họng thùy, mũi và chựa hoa.

Cánh đài trên có hình elip, đỉnh nhọn, màu trắng phớt hồng; bên ngoài cánh không có gân, nhưng bên trong cánh có gân dọc cân đối. Hai cánh đài dưới có hình thuôn dài, đỉnh nhọn, màu trắng phớt hồng; bên ngoài cánh không có gân và bên

trong có gân dọc không rõ nét. Hai cánh vai có hình elip, đỉnh bầu dục, màu trắng phớt hồng; bên trong và bên ngoài cánh vai không có gân và cánh hướng thẳng. Môi hoa có hình trái tim, có lông tơ và màu trắng. Hoa có hai mắt, đậm rõ nét, có xước nhẹ và màu tím hồng. Họng thùy sạch, không lem màu và màu trắng phớt hồng. Chựa sau mũi hoa có màu trắng. Mũi hoa có màu tím hồng.

Hoa lan Giả hạc ĐB thu thập từ Hương Sơn có kích thước trung bình 3–6 cm, có năm cánh cấu tạo như hoa Giả hạc rừng tự nhiên (Hình 1b). Hoa có môi hoa, hai mắt hoa, họng thùy, mũi và chựa hoa. Cánh đài trên và hai cánh đài dưới có hình thuôn dài, đỉnh nhọn, màu trắng tinh khôi; bên ngoài cánh không có gân và bên trong có gân dọc không rõ nét. Hai cánh bên có hình elip, đỉnh tù, màu trắng tinh khôi; bên ngoài cánh không có gân, nhưng bên trong cánh có gân dọc cân đối. Môi hoa bẹt có hình trái tim màu trắng có nhiều lông tơ. Hai mắt không rõ nét và có màu trắng phớt vàng. Họng thùy sạch và không lem màu. Chựa sau mũi hoa và mũi hoa có màu trắng. Như vậy, hoa đột biến có hình thái và màu sắc khác hoàn toàn so với hoa rừng tự nhiên.



Hình 1. Cấu tạo hoa lan Giả hạc rừng tự nhiên Quảng Trị (a) và Giả hạc đột biến (b)

3.2 Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy kết hợp BA đến khả năng hạt nảy mầm tạo protocorm

Hoa lan rừng Quảng Trị sau khi nở ba ngày đã tự thụ phấn cho quả phục vụ thí nghiệm. Hạt được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng với BA ở nồng độ khác nhau để đánh giá tỷ lệ nảy mầm. Kết quả cho thấy rằng sự khác nhau về thành phần khoáng trong môi trường nuôi cấy và nồng độ BA đã có những ảnh hưởng đáng kể đến sự nảy

mầm tạo protocorm của hạt lan đột biến, số liệu cụ thể được trình bày ở Bảng 1.

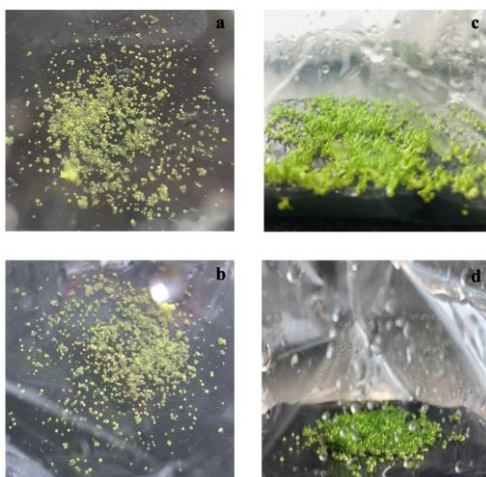
Kết quả Bảng 1 cho thấy hạt của hai mẫu lan Giả hạt TN và ĐB đều có thể nảy mầm trong các môi trường khác nhau, nhưng có sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ nảy mầm. Cụ thể, đối với mẫu quả ĐB, tỉ lệ hạt nảy mầm tạo protocorm đạt cao nhất (93%) ở CT4 trên nền môi trường MS cơ bản kết hợp 0,5 mg/L BA (Hình 2b và 2d). Ở các công thức khác tỷ lệ nảy mầm đạt 28–89%. Điểm đáng lưu ý là tăng nồng độ BA trong môi trường từ 1,0 đến 2,0 mg/L gây ra hiện tượng ức chế quá trình nảy mầm, làm

tỷ lệ này mầm giảm xuống so với tỷ lệ này mầm trong môi trường không có chất kích thích. So với hạt ĐB thì hạt TN có tỷ lệ nảy mầm cao hơn trong tất cả các công thức với tỷ lệ nảy mầm cao nhất ở CT2 và CT4 (97%) (Hình 2a và 2c). Như vậy, có thể nói việc gieo hạt của giống TN có thể diễn ra hiệu quả mà không cần có chất kích thích sinh trưởng và cũng giống như đã phân tích với hạt của giống ĐB, hàm lượng BA cao cũng làm giảm tỷ lệ nảy mầm của hạt TN. Ngoài ra, kết quả thí nghiệm ở Bảng 1 cho thấy MS là môi trường thích hợp để gieo hạt lan Giả hạt hơn môi trường ½ MS.

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy và BA đến khả năng nảy mầm tạo protocorm của hạt lan đột biến

Công thức	Môi trường	BA (mg/L)	Tỉ lệ bình nhiễm (%)		Tỉ lệ bình mẫu phát sinh protocorm (%)	
			TN	ĐB	TN	ĐB
CT1	½ MS cơ bản	0,0	0,0	0,0	94 ^b	83 ^d
CT2	MS cơ bản	0,0	0,0	0,0	97 ^a	89 ^b
CT3	½ MS cơ bản	0,5	0,0	0,0	95 ^b	86 ^c
CT4	MS cơ bản	0,5	3,0	3,3	97 ^a	93 ^a
CT5	½ MS cơ bản	1,0	3,3	3,3	75 ^c	67 ^e
CT6	MS cơ bản	1,0	6,7	0,0	77 ^c	69 ^f
CT7	½ MS cơ bản	2,0	0,0	0,0	30 ^e	28 ^g
CT8	MS cơ bản	2,0	3,3	6,7	36 ^d	34 ^h

Chú thích: Các chữ số khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với $p < 0,05$ (kiểm định Tukey).



Hình 2. Hạt TN nảy mầm (a), hạt ĐB nảy mầm (b), hạt TN tạo protocorm trên CT4 (c) và hạt ĐB tạo protocorm trên CT4 (d)

Ngoài ra, kết quả ở Bảng 1 cũng cho thấy rằng tỉ lệ bình mẫu nhiễm của các công thức là không đáng kể và nhỏ hơn 10%. Đối với mẫu ĐB, công thức có tỉ lệ bình mẫu nhiễm cao nhất là CT8 (6,7%); CT4 và CT5 có tỉ lệ bình mẫu nhiễm là 3,3%; các công thức còn lại không có bình mẫu nhiễm. Đối với mẫu quả TN, công thức có tỉ lệ bình mẫu nhiễm cao nhất là CT6 (6,7%), trong khi CT4, CT5 và CT8 là trong khoảng 3% và các công thức còn lại không có bình mẫu nào bị nhiễm. Điều này cho thấy hiệu quả tốt của phương pháp khử trùng mẫu.

Như vậy, mặc dù tỷ lệ nảy mầm tạo protocorm của hạt ĐB thấp hơn so với hạt TN, nhưng tỉ lệ này đạt trên 90% trong môi trường MS

cơ bản kết hợp với 0,5 mg/L BA. So với những công bố liên quan về lan Giả hạc gieo hạt *in vitro* thì thấy rằng có những công bố thành công trong việc gieo hạt trên môi trường MS cơ bản có hoặc không có chất kích thích sinh trưởng, nhưng cũng có những công bố lại dùng môi trường thích hợp nhất là môi trường Knuds bổ sung hỗn hợp kích thích sinh trưởng. Cụ thể, giống lan Phi điệp tím Hòa Bình đã được gieo hạt thành công trong môi trường MS không có chất kích thích sinh trưởng với tỷ lệ khoảng 93% [18]. Một nghiên cứu khác cũng sử dụng môi trường MS bổ sung BA và NAA để gieo hạt, nhưng tỉ lệ nảy mầm chỉ đạt 85% [15]. Trong khi đó, một nhóm nghiên cứu khác lại gieo hạt thành công trên môi trường Knuds bổ sung kích thích sinh trưởng và tỷ lệ nảy mầm ở công thức tốt nhất chỉ đạt 60%, thấp hơn rất nhiều so với kết quả mà chúng tôi đã đạt được [19]. Như vậy, kết quả của nghiên cứu này cho thấy việc sử dụng môi trường MS kết hợp với 0,5 mg/L BA là phù hợp nhất cho lan Giả hạc đột biến gieo hạt *in vitro* nói riêng và lan Giả hạc nói chung.

3.3 Ảnh hưởng của BA và IBA đến khả năng tạo thể chồi từ protocorm

Sự kết hợp của BA và IBA đã được ứng dụng

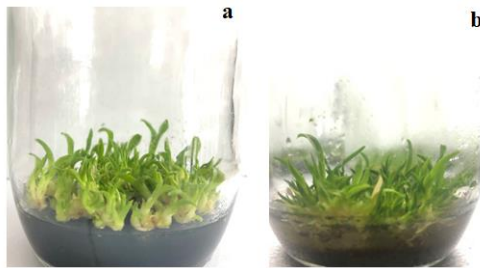
rộng rãi trong nghiên cứu nhân giống cho quá trình tái sinh chồi *in vitro* [20, 21]. Do đó, trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng chất điều hoà sinh trưởng BA kết hợp IBA để thăm dò khả năng hình thành chồi từ protocorm. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỉ lệ protocorm tạo thể chồi, chiều cao chồi và số lá trên chồi. Kết quả được trình bày trong Bảng 2 sau sáu tuần nuôi cấy.

Kết quả Bảng 2 cho thấy rằng sự kết hợp của BA và IBA đã ảnh hưởng đáng kể đến khả năng hình thành thể chồi từ protocorm. Nhìn chung, tỷ lệ tạo chồi của mẫu ĐB là thấp hơn nhiều so với mẫu TN trên mỗi loại môi trường trong thí nghiệm này. Cụ thể, trên môi trường đối chứng không bổ sung chất kích thích sinh trưởng, trong khi tỷ lệ protocorm của mẫu ĐB tạo chồi chỉ đạt 53% thì đối với mẫu TN đạt 74%. Đáng chú ý là protocorm của mẫu ĐB tạo thể chồi đạt cao nhất là 88% trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L BA và 0,5 mg/L IBA (Hình 3b). Tuy nhiên, tỷ lệ này là thấp hơn so với mẫu TN là 11% (Hình 3a). Mặt khác, khi hàm lượng BA trong môi trường nuôi cấy tăng dần thì tỉ lệ protocorm tạo chồi lại giảm dần và thấp nhất khi protocorm được cấy trên môi trường MS cơ bản bổ sung 2,5 mg/L BA là 42% đối với mẫu protocorm ĐB và 50% đối với mẫu protocorm TN (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của BA và IBA đến khả năng tạo chồi từ protocorm

BA	IBA	Tỉ lệ tạo chồi (%)		Chiều cao chồi (cm)		Số lá/chồi	
		TN	ĐB	TN	ĐB	TN	ĐB
0,0	0,0	74 ^c	53 ^c	1,08 ^c	0,82 ^c	2,0 ^c	1,6 ^c
0,5	0,5	86 ^b	66 ^b	1,32 ^b	1,08 ^b	2,4 ^b	2,0 ^b
1,0	0,5	97^a	88^a	1,62^a	1,42^a	2,8^a	2,4^a
1,5	0,5	73 ^c	70 ^b	1,26 ^b	1,14 ^b	2,0 ^c	1,8 ^{bc}
2,0	0,5	63 ^d	55 ^c	0,82 ^d	0,62 ^d	1,4 ^d	1,2 ^d
2,5	0,5	50 ^e	42 ^d	0,52 ^e	0,48 ^e	1,0 ^e	1,0 ^d

Chú thích: Các chữ số khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Kiểm định Tukey).



Hình 3. Protocorm TN (a) và ĐB (b) tạo thể chồi trên môi trường MS +1,0 mg/L BA + 0,5 mg/L IBA

Mặc dù mẫu TN cho thấy sự sinh trưởng tốt hơn mẫu ĐB trong cùng một điều kiện môi trường, tỷ lệ tạo chồi của protocorm từ mẫu ĐB vẫn đạt khá cao. Tỷ lệ này là cao hơn so với một số nghiên cứu trên các giống khác. Cụ thể, Kang và cộng sự đã nghiên cứu sự hình thành chồi từ protocorm của giống *Gastrochilus matsuran* (Makino) Schltr., và tỷ lệ tạo chồi là khoảng 86,7% trên nền môi trường ½ MS cơ bản bổ sung 0,4 mg/L TDZ (Thidiazuron) [22]. Một nghiên cứu khác trên *Dendrobium lasianthera* cho thấy khả năng cảm ứng chồi protocorm cao nhất là 84,0% trên môi trường cơ bản Vacin and Went (VW) bổ sung 2 g/L peptone [23].

Ngoài ra, chiều cao chồi và số lá trên chồi của thể chồi cũng đạt lớn nhất khi protocorm được nuôi cấy trên môi trường MS cơ bản bổ sung 1,0

mg/L BA và 0,5 mg/L IBA với cả hai mẫu ĐB và TN với chỉ số chiều cao chồi lần lượt là 1,42 và 1,62 cm và số lá trung bình trên chồi là 2,4 và 2,8 lá (Hình 3). Chiều cao chồi và số lá trên chồi của hai mẫu ĐB và TN đều có xu hướng giảm dần trên môi trường bổ sung BA với hàm lượng tăng dần (Bảng 2).

Như vậy, trong thí nghiệm này, môi trường MS cơ bản bổ sung 1,0 mg/L BA và 0,5 mg/L IBA là tối ưu cho protocorm tạo thể chồi. Do đó, thể chồi được tiếp tục cho phát triển chồi trên môi trường này.

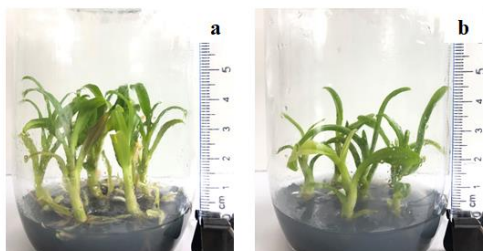
3.4 Ảnh hưởng của IBA và NAA đến khả năng chồi ra rễ tạo cây hoàn chỉnh

Auxin là chất kích thích sinh trưởng quan trọng trong quá trình hình thành rễ của cây, trong đó IBA và NAA đã được ứng dụng trong nuôi cấy nhân giống *in vitro* cho nhiều giống cây trồng bao gồm hoa lan [24–26]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng môi trường MS cơ bản bổ sung riêng lẻ các chất điều hoà sinh trưởng NAA hoặc IBA với nồng độ 0,5–2,0 mg/L để thăm dò khả năng ra rễ của cây. Chồi đạt chiều cao 2,5–3 cm được lựa chọn để cấy sang môi trường ra rễ và kết quả được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ IBA và NAA đến khả năng ra rễ

IBA (mg/L)	NAA (mg/L)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)		Chiều dài rễ (cm)		Số rễ/chồi	
		TN	ĐB	TN	ĐB	TN	ĐB
0	0	65,53 ^f	62,93 ^f	2,65 ^h	2,49 ^g	3,07 ^g	2,83 ^f
0,5	–	93,67 ^{cd}	90,07 ^{cd}	4,17 ^d	3,88 ^{cd}	6,47 ^c	5,27 ^c
1,0	–	98,80^b	97,80^b	5,27^b	4,94^b	8,87^b	7,73^b
1,5	–	92,93 ^d	89,47 ^d	3,85 ^e	3,64 ^d	6,40 ^c	4,53 ^d
2,0	–	81,67 ^e	80,07 ^e	2,98 ^g	2,77 ^f	3,93 ^f	2,87 ^g
–	0,5	95,13 ^c	92,13 ^c	4,55 ^c	4,05 ^c	6,06 ^d	5,47 ^c
–	1,0	100,00^a	99,06^a	5,54^a	5,34^a	9,53^a	8,53^a
–	1,5	93,76 ^{cd}	91,53 ^{cd}	4,05 ^{de}	3,76 ^{cd}	5,87 ^e	5,33 ^c
–	2,0	82,33 ^e	81,86 ^e	3,11 ^f	2,90 ^e	4,13 ^f	3,13 ^e

Chú thích: Các chữ số khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Kiểm định Tukey)



Hình 4. Tạo cây hoàn chỉnh của mẫu chồi TN (a) và chồi ĐB (b) trên môi trường MS cơ bản bổ sung 1,0 mg/L NAA

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy rằng khi tăng nồng độ IBA hay NAA 0,5–1,0 mg/L, tỷ lệ chồi ra rễ, chiều dài rễ cũng như số rễ/chồi đều tăng lên với cả hai mẫu chồi ĐB và TN. Với mẫu chồi ĐB, khi bổ sung chất kích thích sinh trưởng IBA hoặc NAA với cùng nồng độ 1,0 mg/L cho kết quả tốt. Tuy nhiên, môi trường NAA cho kết quả tốt hơn với tỷ lệ chồi ra rễ đạt 99,06%, chiều dài rễ đạt 5,34 cm (Hình 4b) và có trung bình 8,53 rễ/chồi so với 97,80% tỷ lệ chồi ra rễ, 4,94 cm chiều dài rễ và 7,73 rễ/chồi trên môi trường bổ sung 1,0 mg/L IBA. Với mẫu chồi TN, nồng độ NAA 1,0 mg/L cho kết quả tốt nhất; tỷ lệ chồi ra rễ đạt 100%, với chiều dài rễ đạt 5,54 cm, có trung bình 9,53 rễ/chồi (Hình 4a). Môi trường MS bổ sung IBA cho kết quả thấp hơn đáng kể với cùng nồng độ với tỷ lệ chồi ra rễ đạt 98,80%, chiều dài rễ trung bình đạt 5,27 cm, có trung bình 8,87 rễ/chồi.

Tiếp tục tăng nồng độ chất kích thích sinh trưởng lên 1,5 và 2,0 mg/L thì tỷ lệ chồi ra rễ, chiều dài rễ và số rễ/chồi đều giảm. Điều này chứng tỏ nồng độ chất kích thích sinh trưởng cao đã làm

giảm tốc độ sinh trưởng của cây, làm cho chiều dài rễ cũng như số rễ trên chồi giảm.

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy rằng môi trường MS cơ bản bổ sung 1 mg/L NAA là môi trường tốt nhất cho cây ra rễ. Kết quả của nghiên cứu này là tương đồng với nghiên cứu của Dan và cộng sự đối với hoa lan *Renanthera imschootiana* [27]. Tác giả chỉ ra rằng môi trường MS bổ sung 1 mg/L NAA là tốt nhất cho chồi ra rễ, nhưng số rễ chỉ đạt 2,4 rễ/chồi. Bên cạnh đó, một số nghiên cứu trước đã công bố sử dụng trên môi trường khác là phù hợp cho chồi tạo rễ. Trong đó, nghiên cứu trên giống *Dendrobium thyrsiflorum* của Tikendra và cs. nhận định rằng môi trường MS bổ sung 2 mg/L IAA là thích hợp cho chồi tạo rễ với 6,5 rễ/chồi [28]. Nghiên cứu trên lan *Renanthera Imschootiana Rolfe* của Dân và cs. cũng chỉ ra rằng môi trường thích hợp nhất cho chồi tạo rễ là MS + 1 mg/L NAA với số rễ là 2,4 rễ/chồi và chiều dài rễ trung bình 3,73 cm [27].

Như vậy, có thể thấy rằng mỗi nghiên cứu đưa ra một môi trường thích hợp cho chồi *in vitro* tạo rễ, nhưng môi trường sử dụng trong nghiên cứu này cho kết quả chồi ra rễ và chiều dài rễ đạt cao nhất.

3.5 Cây ra vườn ươm

Cây con sau khi ra vườn được đánh giá là có khả năng thích ứng tốt với điều kiện môi trường (Bảng 4).

Bảng 4. Khả năng sinh trưởng của cây *in vitro* sau khi ra vườn ươm

Ngày sau trồng	Tỷ lệ sống (%)		Tỷ lệ chết (%)		Tỷ lệ bệnh (%)		Số lá mới/cây	
	TN	ĐB	TN	ĐB	TN	ĐB	TN	ĐB
0	100	100	0	0	0	0	0	0
15	98,0	98,0	0	0	2	2,2	0	0
30	95,7	95,5	2,0	2,0	2,3	2,5	1,0	1,0
45	93,5 ^a	88,2 ^b	4,5 ^b	9,0 ^a	2,0 ^b	2,8 ^a	1,2 ^a	1,1 ^a
60	93,5 ^a	84,9 ^b	4,5 ^b	12,3 ^a	2,0 ^b	2,8 ^a	1,5 ^a	1,3 ^b

Chú thích: Các chữ số khác nhau trên cùng một hàng chỉ sự sai khác theo cặp đôi có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Kiểm định Tukey).



Hình 5. Cây *in vitro* ĐB sau 60 ngày ra cây

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy cây con *in vitro* giống ĐB có tỷ lệ sống giảm dần sau 60 ngày ra vườn và đạt 84,9% tại thời điểm 60 ngày (Hình 5), nhưng cây con *in vitro* giống TN có tỷ lệ sống cao hơn (93,5%). Đặc biệt, tỉ lệ chết của cây con *in vitro* giống ĐB sau 60 ngày ra vườn vẫn còn tăng (từ 2,0% ở thời điểm 30 ngày sau ra vườn đến 12,3% sau 60 ngày ra vườn) thì cây con *in vitro* từ giống TN đã ổn định và tỷ lệ chết chỉ 4,5% sau 60 ngày ra vườn. Đáng chú ý, cây con của cả hai mẫu đều cho lá mới như nhau ở thời điểm 30 ngày sau trồng (một lá mới/cây). Đây là dấu hiệu của sự sinh trưởng phát triển và thích ứng với môi trường của cây. Tuy nhiên, chỉ số này có khác biệt đáng kể ở thời điểm 60 ngày sau trồng, đối với cây *in vitro* giống ĐB đạt 1,3 lá mới/cây so với giống TN có số lá mới cao hơn và trung bình đạt 1,5 lá mới/cây. Đặc biệt, tỷ lệ bệnh của cây *in vitro* của cả hai giống là thấp hơn 3% và đã ổn định sau 60 ngày ra vườn.

Kết quả sau khi ra vườn cho thấy khả năng sinh trưởng của cây *in vitro* giống ĐB là chậm hơn so với cây *in vitro* giống TN, nhưng tỉ lệ sống của cây *in vitro* ĐB cao hơn so với nghiên cứu của Kabir và cs. trên giống *D. fimbriatum* Hook, sau khi ra vườn có tỷ lệ sống là 83,6% [29]; nghiên cứu của Pryza và cs. trên giống *D. Sonia* 'Earsakul' chỉ

đạt 66,67 % trên giá thể than và đá nhỏ (1:1) [30]; nghiên cứu của Lộc và Nguyễn trên giống lan *Dendrobium lituiflorum* Lindl. công bố tỷ lệ sống của cây *in vitro* là 70% [31]. Ngược lại, kết quả trong thí nghiệm này lại thấp hơn so với một số nghiên cứu khác như nghiên cứu trên lan Trầm tím *Dendrobium nestor* của Phan và cs., hoặc trên lan *Miltonia* SP. của Huyền và cs. với tỷ lệ sống của cây *in vitro* sau khi ra vườn ươm đạt lần lượt là 93,33 và 90% trên giá thể dớn [32, 33]. Do đó, cần có nghiên cứu sâu hơn về giai đoạn ra vườn ươm về giống lan đột biến để nâng cao tỷ lệ sống và đánh giá tính đồng nhất trong di truyền.

4 Kết luận

Nghiên cứu này đã nhân giống thành công giống lan Giả hạc đột biến bằng phương pháp gieo hạt *in vitro*. Môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L BA thích hợp cho hạt đột biến này mầm tạo protocorm. Môi trường MS bổ sung 1 mg/L BA và 0,5 mg/L IBA phù hợp nhất cho protocorm giống đột biến tạo chồi và phát triển chồi. Chồi đột biến tạo cây hoàn chỉnh tốt nhất trên môi trường MS bổ sung 1 mg/L NAA. Nghiên cứu này bước đầu đánh giá được cây con *in vitro* giống đột biến sau khi ra vườn trên giá thể xơ dừa và trấu hun (1:1) cho tỷ lệ sống cao (84,9%). Tuy nhiên, cần có nhiều nghiên cứu hơn nữa đối với giống lan Giả hạc đột biến trong giai đoạn phát triển cây con *in vitro* và ra hoa.

Thông tin tài trợ

Nghiên cứu này được tài trợ từ chương trình Khoa học Công nghệ cấp Tỉnh Quảng Trị, mã số 07/2020/ĐT.

Mâu thuẫn lợi ích

Các tác giả tuyên bố không có mâu thuẫn nào liên quan đến việc xuất bản bài báo này.

Tài liệu tham khảo

1. Da Silva JAT, Zeng S, Cardoso JC, Dobránszki J, Kerbauy GB. *In vitro* flowering of *Dendrobium*. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2014;119(3):447-56.
2. Da Silva JAT, Cardoso JC, Dobránszki J, Zeng S. *Dendrobium* micropropagation: a review. Plant Cell Rep. 2015;34(5):671-704.
3. Rattana K, Sangchanjiradet S. Micropropagation of *Dendrobium signatum* Rchb.f.. Pertanika Journal of Tropical Agricultural science. 2017;40(4).
4. Maharjan S, Thakuri L Sen, Thapa BB, Pradhan S, Pant KK, Joshi GP, et al. *In vitro* propagation of the endangered orchid *Dendrobium chryseum* Rolfe from protocorms culture. Nepal Journal of Science and Technology. 2020;19(1):39-47.
5. Thanh NV. The danger of depleting forest orchids [Internet]. Agricultural Vietnam Artical. 2015 [cited 2021 May 10]. Available from: <https://nongnghiep.vn/nguy-co-can-kiet-lan-rung-d137678.html>
6. Martin KP, Madassery J. Rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm-like bodies. Sci Hortic (Amsterdam). 2006;108(1):95-9.
7. Pant B, Thapa D. *In vitro* mass propagation of an epiphytic orchid, *Dendrobium primulinum* Lindl. through shoot tip culture. African J Biotechnol. 2012;11(42):9970-4.
8. Puchooa D. Comparison of different culture media for the *in vitro* culture of *Dendrobium* (Orchidaceae). Int J Agric Biol. 2004;6:884-8.
9. Lan VN, Anh NTL. Nhân giống *in vitro* loài lan bản địa *Dendrobium nobile* Lindl. Tạp chí Khoa học và Phát triển. 2013;11(7):917-25.
10. Maharjan S, Pradhan S, Thapa BB, Pant B. *In vitro* propagation of endangered orchid, *Vanda pumila* Hook. f. through protocorms culture. Am J Plant Sci. 2019;10(07):1220.
11. Thắm ĐT, H'Yon NB, Hằng NTT, Khiêm ĐV, Duy NV, Vinh TT, Lợi QV, Công VK. Vi nhân giống lan Nhất điểm hoàng (*Denrobium heterocarpum* Lindl). Tạp Chí Công Nghệ Sinh Học. 2018;16(1):127-35.
12. Murashige T, Skoog E. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plantarum. 1962;(15):473-97.
13. Hiền PTT, Đính NV. Nhân giống lan Đại châu đỏ (*Rhynchostylis gigantea* L.) bằng công nghệ nuôi cấy *in vitro*. VNU J Sci Nat Sci Technol. 2017;33(1):48-57.
14. Chiến HĐ, Đính NV, Trang VT, Xuân ĐT, Bằng CP. Nhân giống *in vitro* lan Mokara thông qua protocorm-like body từ mô lá. TNU J Sci Technol. 2020;225(08):280-5.
15. Duyên NTM. Quy trình vi nhân giống lan Giả hạc (*Dendrobium anosmum*). AGU Int J Sci. 2021;27(1):73-82.
16. Diễm NT, Oanh NT, Tâm HT, Thọ NH, Cúc NTK. Cultivation of *Dendrobium anosmum* Di Linh from *in vitro* seedlings. Hue Univ J Sci Nat Sci. 2021;130(1A):107-15.
17. De LC, Rao AN, Rajeeva PK, Srivastava M. Morphological characterization in *Dendrobium* species. J Biosci. 2015;4(1):1198-215.
18. Liên ĐQ, Hương ĐTT, Việt NV, Hung VT. Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* trong nhân giống lan phi điệp tím Hoà Bình (*Dendrobium anosmum* Lindley). Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp. 2019;6:9-16.
19. Trang NQ, Huệ VT, Ninh KTH, Thơ NT. Nhân giống lan phi điệp tím (*Dendrobium anosmum*). Tạp chí Khoa Học và Công Nghệ Lâm Nghiệp. 2013;3(1):16-21.
20. Riva SS, Islam A, Hoque ME. *In vitro* regeneration and rapid multiplication of *Dendrobium bensoniae*, an indigenous ornamental orchid. Agric. 2016;14(2):24-31.
21. Murti RH, Yeoung YR. Effects of BA and IBA concentrations and subculture frequent on meristem culture of strawberry. ARPN J Agric Biol Sci. 2013;8(5):405-10.
22. Kang H, Kang KW, Kim DH, Sivanesan I. *In vitro* propagation of *Gastrochilus matsuran* (Makino) Schltr., an endangered epiphytic orchid. Plants. 2020;9(4):524.
23. Utami ESW, Hariyanto S, Manuhara YSW. *In vitro* propagation of the endangered medicinal orchid, *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm through mature seed culture. Asian Pac J Trop Biomed [Internet]. 2017;7(5):406-10.
24. Kumar KV, Fatmi U. Effects of IBA and NAA on shoot growth of cuttings of various ornamental plants in water as rooting medium. J Pharmacogn Phytochem. 2021;10(2):685-7.

25. Kaushik S, Shukla N. A review on effect of IBA and NAA and their combination on the rooting of stem cuttings of different ornamental crops. *J Pharmacogn Phytochem.* 2020;9(3):1881-5.
26. Copes DL, Mandel NL. Effects of IBA and NAA treatments on rooting Douglas-fir stem cuttings. *New For.* 2000;20(3):249-57.
27. Dành TQ, Ly NM, Tuan VC. In vitro propagation of a precious orchid species, *Renanthera Imschootiana* Rolfe. *Univ Danang-Journal Sci Technol.* 2018;3(124):89-93.
28. Tikendra L, Amom T, Nongdam P. Effect of phytohormones on rapid in vitro propagation of *Dendrobium thyrsiflorum* Rchb. f.: An endangered medicinal orchid. *Pharmacogn Mag.* 2018;14(58):495.
29. Kabir MF, Rahman MS, Jamal A, Rahman M, Khalekuzzaman M. Multiple shoot regeneration in *Dendrobium fimbriatum* Hook. an ornamental orchid. *J Anim Plant Sci.* 2013;23(4):1140-5.
30. Priya KI, Sabina GT, Rajmohan K. Influence of plant growth regulators on in vitro clonal propagation of *Dendrobium Sonia'Earsakul'*. *J Bio Innov.* 2013;2(2):51-8.
31. Lộc PV, Nguyễn NPH. Ảnh hưởng của một số yếu tố nuôi cấy lan hoàng thảo kèn (*Dendrobium lituiflorum* Lindl.) trong điều kiện thoáng khí. *Can Tho Univ J Sci.* 2020;56(CĐ Tự nhiên):67-71.
32. Huyền PX, Cương HV, Hoàng NTP. Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây hoa lan *Miltonia* sp. *Tạp chí Khoa học và Phát triển.* 2015;13(7):1128-35.
33. Phan VT, Ninh KTH, Thọ NT. Nghiên cứu nhân giống *in vitro* Lan trầm tím (*Dendrobium nestor*). *Tạp chí Khoa Học và Công Nghệ Lâm Nghiệp.* 2019;1:38-44.