



QUY TRÌNH VI NHÂN GIỐNG LAN GIẢ HẠC (*Dendrobium anosmum*)

Nguyễn Thị Mỹ Duyên¹

¹Trường Đại học An Giang, ĐHQG-HCM

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 20/08/2019

Ngày nhận kết quả bình duyệt:
30/03/2020

Ngày chấp nhận đăng:
01/2021

Title:

The process of micropropagation *Dendrobium anosmum*.

Keywords:

Dendrobium anosmum, MS medium, plant tissue culture, propagation in vitro, Substrate

Từ khóa:

Giá thể, lan Giả hạc, môi trường MS, nhân giống in vitro, nuôi cấy mô thực vật

ABSTRACT

This study was carried out to complete the process of micropropagation the orchid (*Dendrobium anosmum*) in order to provide seedlings. The research includes six experiments which were performed with one random factor. The result showed: (1) Seeds of *D. anosmum* germinated well on MS medium + 1 mg/l BA + 0,2 mg/l NAA or MS medium + 1 mg/l NAA with germination rate at 85% after 3 months cultivated; (2) MS medium + 1 mg/l BA and 2 mg/l BA is good for the multiplication of the shoot with the method of cutting the shoots into segments on MS medium + 0,5mg/l NAA + 3 mg/l BA with 12,50 shoot after 12 week cultivated (3); (4) The *D. anosmum* explants creating complete plants was the most effective on the three medium which were MS + 30 g/l sucrose, MS/2 + 20 g/l sucrose and MS/2 + 30 g/l sucrose; (5) In the taming stage, *D. anosmum* achieved the high survival rate 67.6% on MS/2 + 30 g/l sucrose; (6) After surveying the growth potential of *D. anosmum* propagated by tissue culture method on several substrates, the recorded survival rate of seedlings was highest (66.67%) on wood charcoal + fern root after 120 days.

TÓM TẮT

Đề tài được thực hiện nhằm hoàn thiện quy trình vi nhân giống lan Giả hạc (*Dendrobium anosmum*) để cung cấp nguồn cây giống là hết sức cần thiết hiện nay. Đề tài gồm 6 thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố. Kết quả cho thấy: (1) Hạt lan Giả hạc nảy mầm tốt trên môi trường MS + 1 mg/l BA + 0,2 mg/l NAA hoặc MS + 1 mg/l NAA với tỷ lệ $\geq 85\%$ sau 3 tháng nuôi cấy; (2) Môi trường thích hợp cho giai đoạn nhân nhanh chồi là môi trường MS có BA ở nồng độ 1 mg/l và 2 mg/l với kiểu cấy cắt chồi thành từng đoạn trên môi trường MS + 0,5mg/l NAA + 3 mg/l BA tạo được 12,50 chồi sau 12 tuần (3); (4) Những mẫu lan Giả hạc in vitro tạo cây hoàn chỉnh đạt hiệu quả nhất trên ba môi trường là MS + 30 g/l đường, MS/2 + 20 g/l đường và MS/2 + 30 g/l đường; (5) Ở giai đoạn thuần dưỡng, lan Giả hạc cấy mô đạt tỉ lệ sống cao ở môi trường MS/2 + 30 g/l đường với tỉ lệ 67,60%; (6) Lan Giả hạc cấy mô đạt tỉ lệ sống cao 66,67% trên giá thể than + dớn nhuyễn sau 120 ngày.

1. GIỚI THIỆU

Lan rừng Việt Nam có hơn 2.000 loài với rất nhiều loài đẹp và có triển vọng kinh doanh trong lĩnh vực thương mại. Theo Phan Thúc Huân (2005), đã có 300 loài lan rừng Việt Nam được nhiều nhà nghiên cứu, sưu tầm lan chọn lọc để sản xuất, nhân giống, cung cấp cho thị trường thế giới. Trong đó, *Dendrobium* là một trong 6 giống phong lan rừng phổ biến được mọi người ưa chuộng, mà đại diện là *Denbrobium anosmum* (lan Giả hạc). Theo Trần Văn Bảo (1999), lan Giả hạc là loài lan rừng quý hiếm ở Việt Nam có nhiều trên dãy núi Trường Sơn từ Nam ra Bắc, đặc điểm của loài này là siêng hoa, hoa to, đẹp và có hương rất thơm.

Tuy nhiên, lan Giả hạc rừng tự nhiên hiện nay rất khan hiếm do bị khai thác quá mức, tại các phòng nuôi cấy mô trong nước ít có đề tài nghiên cứu về nhân giống lan Giả hạc. Đồng thời, vấn đề tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh và thuần dưỡng cây con sau giai đoạn vườn ươm đang còn gặp nhiều khó khăn nên tỉ lệ cây con chết khi chuyển ra vườn ươm còn khá cao. Đó đó, nguồn cây giống lan Giả hạc *in vitro* trong nước chưa cung cấp đủ nhu cầu thị trường nên giá thành cây lan giống còn khá cao.

Xuất phát từ những cơ sở trên, nghiên cứu được thực hiện nhằm hoàn thiện quy trình vi nhân

giống lan Giả hạc để cung ứng nhu cầu thị trường đồng thời bảo tồn nguồn cây giống để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo về lan Giả hạc.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Địa điểm và thời gian

Thí nghiệm gieo hạt và nhân chồi được thực hiện trong phòng nuôi cấy mô, Bộ môn Công nghệ Sinh học, Trường Đại học An Giang. Thí nghiệm thuần dưỡng được thực hiện tại vườn lan, Trường Đại học An Giang. Thời gian từ tháng 9/2015 đến tháng 7/2017.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Thí nghiệm 1: Khảo sát một số môi trường gieo hạt thích hợp

- Vật liệu: trái lan *D. anosmum* được thụ phấn từ cây lan giống tại Vườn lan Trường Đại học An Giang, sau 4 tháng cắt trái khử trùng.
- Môi trường nuôi cấy: môi trường MS có bổ sung BA và NAA.
- Bố trí thí nghiệm: bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 6 nghiệm thức (Bảng 1), 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là một keo.
- Chỉ tiêu theo dõi: ngày xuất hiện màu xanh, ngày hạt nảy chồi, tỷ lệ nảy chồi.

Bảng 1. Các nghiệm thức thí nghiệm

Nồng độ BA (mg/l)	Nồng độ NAA (mg/l)		
	0	0,2	1
0	NT1	NT4	NT6
1	NT2	NT5	
2	NT3		

2.2.2 Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng BA (6-benzyl-aminopurine) lên sự nhân chồi

- Vật liệu: chọn chồi ở thí nghiệm 1 cao khoảng 10 mm, cây sang môi trường nhân chồi.
- Môi trường nhân chồi: môi trường MS bổ sung BA ở nồng độ 0, 1, 2, 5, 10 (mg/l).

- Bố trí thí nghiệm: bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 nghiệm thức (A₀-A₄), 4 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 4 keo, cây 4 mẫu/keo.
- Chỉ tiêu theo dõi: số chồi: trung bình số chồi mới tạo thành; chiều cao chồi (cm): trung bình

chiều cao các chồi mới tạo thành; số lá: trung bình số lá trên các chồi mới hình thành.

2.2.3 Thí nghiệm 3: Khảo sát hàm lượng auxin và cytokinin thích hợp để nhân nhanh chồi

- Vật liệu: mẫu chồi lan Giả hạt *in vitro* từ thí nghiệm 2.
- Môi trường nhân nhanh chồi: môi trường MS có bổ sung BA và NAA ở các nồng độ khác nhau.
- Bố trí thí nghiệm:
 - Thí nghiệm 3a: được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 nghiệm thức (B₀-B₄), 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 1 keo. Cây 2 chồi/keo.
 - Thí nghiệm 3b: được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 nghiệm thức (C₀-C₄), 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 1 keo, 2 chồi cắt thành 4 mẫu cây.
- Chỉ tiêu theo dõi: số chồi: trung bình số chồi mới hình thành; chiều cao chồi (cm): trung bình chiều cao các chồi mới tạo thành; số lá: trung bình số lá trên các chồi mới hình thành.

2.2.4 Thí nghiệm 4: Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng đường trong môi trường MS, MS/2 đến khả năng tạo cây hoàn chỉnh của chồi lan Giả hạt *in vitro*

- Vật liệu: chồi lan Giả hạt *in vitro* cao khoảng 1 cm.
- Môi trường nuôi cấy: môi trường MS, MS/2 (giảm một nửa thể tích dung dịch khoáng đa lượng so với môi trường MS) có bổ sung hàm lượng đường sucrose từ 0 đến 30 g/l, nồng độ NAA cố định (1 mg/l).
- Bố trí thí nghiệm: bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 7 nghiệm thức (D₀-D₆), mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 7 keo. Cây 3 mẫu/keo.
- Chỉ tiêu theo dõi: số lượng rễ; chiều dài rễ trung bình (cm): đo từ gốc rễ đến chóp rễ của 3 rễ dài nhất; số lá; chiều cao chồi chính (cm): đo từ mặt thạch đến đỉnh chồi.
- Thời gian theo dõi: 30, 60, 90 ngày sau khi cấy.

2.2.5 Thí nghiệm 5: Khảo sát khả năng thích nghi của lan Giả hạt cấy mô ở giai đoạn thuần dưỡng

- Vật liệu: những cây lan con hoàn chỉnh thu từ thí nghiệm 4 được chuyển từ phòng lạnh sang phòng nhiệt độ thường trong một tuần, nhằm giúp cây quen dần với điều kiện bình thường. Sau đó, chúng được thuần dưỡng trong điều kiện ánh sáng nhẹ (sử dụng lưới che để giảm sáng), tránh mưa.
- Bố trí thí nghiệm: bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên, gồm 6 nghiệm thức (D₁-D₆), mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 2 chậu, mỗi chậu trồng 10 cây theo từng nghiệm thức ở thí nghiệm 4.
- Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ cây sống (%) = $\frac{\text{Tổng số cây sống}}{\text{Tổng số cây}} \times 100$
- Thời gian theo dõi: 10, 20, 30 ngày sau khi thuần dưỡng.

2.2.6 Thí nghiệm 6: Khảo sát khả năng tăng trưởng của cây lan Giả hạt cấy mô trên các loại giá thể khác nhau

- Vật liệu: những cây lan Giả hạt cấy mô thu được từ thí nghiệm 5 (cao từ 2-3 cm, có từ 3 - 4 lá, bộ rễ khỏe).
- Bố trí thí nghiệm: bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 nghiệm thức (E₁-E₅), mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là một chậu, mỗi chậu trồng 10 cây.
- Chỉ tiêu theo dõi:
 - Tỷ lệ cây sống (%) = $\frac{\text{Tổng số cây sống}}{\text{Tổng số cây}} \times 100$
 - Số chồi; chiều cao cây (cm): đo từ gốc cây đến đỉnh thân; số lá; chiều dài lá trung bình (cm): đo từ đầu đến chót lá.
- Thời gian theo dõi: 30, 60, 120 ngày sau khi trồng.

2.2.7 Xử lý số liệu: tất cả các nghiệm thức đều được xử lý bằng phần mềm SAS 9.1.3.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thí nghiệm 1: Khảo sát một số môi trường gieo hạt thích hợp

Trái lan sau khi được khử trùng, xẻ lấy hạt cấy vào môi trường cơ bản MS có bổ sung BA và NAA với các nồng độ khác nhau. Hạt lan mới gieo sẽ rất mịn và có màu trắng. Sau 30 ngày gieo cấy thì hạt bắt đầu chuyển hóa và có màu xanh và 75 ngày sau khi gieo (NSKG) thì tất cả các hạt lan đều nảy chồi thành cây con. Nghiệm thức NT5 (MS + 1 mg/l BA + 0,2 mg/l NAA) và NT6 (MS + 1 mg/l NAA) sau 60 NSKG đều cho tỷ lệ hạt có màu xanh là cao nhất và cũng cho tỷ lệ hạt nảy chồi cao nhất ở 90 NSKG là $\geq 85\%$. Đây là hai môi trường thích hợp nhất cho hạt lan nảy mầm. Điều này chứng tỏ môi trường MS có BA và NAA kết hợp với tỷ lệ thích hợp (5:1) sẽ cho hạt

nảy chồi tốt hơn. Với môi trường MS có NAA cao ở mức 1 mg/l cũng cho kết quả tương tự.

3.2 Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng BA (6-benzyl-aminopurine) lên sự nhân chồi

Ở thời điểm 10 ngày sau khi cấy (NSKC), chồi mới đã bắt đầu xuất hiện ở các nghiệm thức, tuy nhiên sự khác biệt là không đáng kể. Do mẫu mới cấy nên mới bắt đầu cảm ứng được với môi trường mới, việc xuất hiện chồi mới có khả năng là do cây có chứa hàm lượng cytokinin nội sinh cao, nên tự có khả năng nảy chồi. Đến 70, 80, 90 NSKC, chồi mới đã xuất hiện đầy đủ ở các nghiệm thức.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ BA đến sự nhân chồi lan Giã hạt 90 NSKC

Nghiệm thức	BA (mg/l)	Số chồi	Số lá	Chiều cao chồi (cm)
A ₀	0	1,42 c	2,67 b	1,53
A ₁	1	2,58 ab	4,35 a	2,20
A ₂	2	3,17 a	4,42 a	2,06
A ₃	5	2,00 bc	3,17 ab	1,69
A ₄	10	1,50 c	2,22 b	1,50
CV (%)		23,93	16,36	18,94
F		*	**	ns

Ghi chú: Trên cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi các chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa; ns: không khác biệt thống kê, *: khác biệt có ý nghĩa ở mức 5%, **: khác biệt có ý nghĩa ở mức 1%.

Như vậy, đối với môi trường MS có BA ở nồng độ 1 mg/l và 2 mg/l cho khả năng nhân chồi tốt nhất, tốt hơn khi không có sử dụng BA (A₀, BA = 0 mg/l). Ngược lại, khi BA ở nồng độ quá cao cũng không cho kết quả tốt, điển hình là ở nghiệm thức A₃, A₄ với BA tương ứng là 5 mg/l và 10 mg/l. Kết quả này đáng ghi nhận khi chỉ sử dụng một loại kích tố tăng trưởng là BA nồng độ 2 mg/l mà chiều cao chồi đạt 4,42 cm sau 12 tuần. Trong nghiên cứu của Nguyễn Quỳnh Trang và cs. (2013), sử dụng môi trường Knuds bổ sung hai loại kích tố tăng trưởng Kientin (0,1 ,g/l) và GA₃ (0,5 mg/l) thuộc nhóm kích tố kéo dài chồi với cao chồi đạt 2,45 cm sau 3 tuần.

3.3 Thí nghiệm 3: Khảo sát hàm lượng auxin và cytokinin thích hợp để nhân nhanh chồi

❖ Thí nghiệm 3a:

Với kiểu cấy nguyên chồi, 12 tuần sau khi cấy (TSKC) giữa các nghiệm thức có sự khác biệt ở mức 5% về mặt thống kê. Trong đó, nghiệm thức B₄ cho kết quả số chồi tốt nhất 8,76 chồi, nghiệm thức B₂ có chiều cao chồi cao nhất 12,20 cm và nghiệm thức B₃ đạt số lá nhiều nhất 3,20 lá, tuy nhiên 3 nghiệm thức này khác biệt không đáng kể (Bảng 3). Đồng thời, nghiệm thức đối chứng B₀ đạt kết quả thấp nhất ở cả 3 chỉ tiêu.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng NAA và BA đến sự nhân nhanh chồi nguyên của lan Giả hạc 12 TSKC

Nghiệm thức	NAA (mg/l)	BA (mg/l)	Số chồi	Chiều cao chồi (cm)	Số lá
B₀	0	0	1,43 c	1,67 c	0,40 b
B₁	0	2	4,68 bc	5,40 b	2,20 a
B₂	0,5	2	6,33 ab	12,20 a	2,63 a
B₃	0	3	5,13 abc	9,10 a	3,20 a
B₄	0,5	3	8,76 a	10,20 a	2,86 a
CV (%)			32,30	26,57	27,75
F			*	*	*

Ghi chú: Trên cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi các chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa; *: khác biệt có ý nghĩa ở mức 5%.

❖ Thí nghiệm 3b:

Thời điểm 12 TSKC, với kiểu cấy cắt chồi thành từng đoạn ta thấy, nghiệm thức C₄ đạt số chồi nhiều nhất 12,50 chồi và cho số lá nhiều nhất 3,50

lá tương đương nghiệm thức C₁ và nghiệm thức C₂ có chiều cao chồi cao nhất 16,67 cm, giữa các nghiệm thức có sự khác biệt thống kê (Bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng NAA và BA đến sự nhân nhanh chồi nguyên của lan Giả hạc cắt đoạn thời điểm 12 TSKC

Nghiệm thức	NAA (mg/l)	BA (mg/l)	Số chồi	Chiều cao chồi (cm)	Số lá
C₀	0	0	3,26 c	7,83 b	2,16 b
C₁	0	2	8,53 abc	12,00 ab	3,50 a
C₂	0,5	2	10,50 ab	16,67 a	3,16 a
C₃	0	3	5,53 bc	8,66b	3,00 ab
C₄	0,5	3	12,50 a	15,83 a	3,50 a
CV (%)			37,58	24,73	16,17
F			*	*	*

Ghi chú: Trên cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi các chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa; *: khác biệt có ý nghĩa ở mức 5%.

Qua đó ta thấy, môi trường cho kết quả nhân chồi tốt nhất khi bổ sung NAA ở nồng độ 0,5 mg/l và BA ở nồng độ 2 mg/l và 3 mg/l. Đồng thời, kết quả cũng cho thấy hiệu quả nhân chồi lan Giả hạc khá cao và ưu thế khi sử dụng kỹ thuật cấy cắt chồi thành từng đốt. Cụ thể như ở nghiệm thức số 4 cùng một môi trường nhưng khi cắt chồi thành từng đoạn (C₄) đạt 12,50 chồi sau 12 tuần trong khi ở thí nghiệm không cắt đoạn thân (B₄) chỉ đạt 8,76 chồi. Điều này phù hợp với thí nghiệm của Chen và ctv. (2006), khi cắt đốt sẽ kích thích việc

tái sinh chồi bên rất mạnh, tỷ lệ chồi mới tạo thành cao hơn khi không cắt.

3.4 Thí nghiệm 4: Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng đường trong môi trường MS, MS/2 đến khả năng tạo cây hoàn chỉnh của chồi lan Giả hạc in vitro

Theo quan sát giai đoạn 30 NSKC, các chồi lan đã xuất hiện rõ ở hầu hết các nghiệm thức trừ nghiệm thức D₀ và kéo dài đến 90 NSKC, phần lớn các chồi ở nghiệm thức này có màu xanh nhạt,

nhỏ và kém phát triển. Kết quả Bảng 5 cho thấy, khả năng hình thành rễ và kéo dài rễ đạt hiệu quả cao nhất ở nghiệm thức D₃ với 5,99 rễ và chiều dài rễ trung bình là 1,18 cm, nhưng không có sự khác biệt về mật thống kê so với nghiệm thức D₅ và D₆ về cả hai chỉ tiêu trên. Khi cây được cấy

trên môi trường Knuds bổ sung 0,5 mg/l IBA hoặc bổ sung 0,3 mg/l IBA + 0,1 mg/l NAA sau 3 tuần đã tạo được trên 3 rễ/chồi trong nghiên cứu của Nguyễn Quỳnh Trang và cs. (2013). Điều này cho thấy, loài *D.anosmum* dễ thích nghi và phát triển tốt trên nhiều loại môi trường nuôi cấy.

Bảng 5. Kết quả tạo cây hoàn chỉnh của chồi lan Giả hạc *in vitro* 90 NSKC

Nghiệm thức	MS + sucrose (mg/l)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá
D ₀	MS + 0	0,00 e	0,00 d	1,52 b	4,98 b
D ₁	MS + 10	1,34 d	0,63 bc	1,80 a	4,99 b
D ₂	MS + 20	4,63 b	0,93 ab	1,94 a	5,31 ab
D ₃	MS + 30	5,99 a	1,18 a	1,85 a	5,25 ab
D ₄	MS/2 + 10	2,67 c	0,56 c	1,78 a	5,43 a
D ₅	MS/2 + 20	5,27 ab	1,02 a	1,96 a	5,49 a
D ₆	MS/2 + 30	5,27 ab	1,10 a	1,97 a	5,01 b
CV (%)		14,2	23,1	5,7	4,2
F		**	**	**	*

Ghi chú: Trên cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi các chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa; **: các nghiệm thức khác biệt có ý nghĩa ở mức 1%, *: các nghiệm thức khác biệt có ý nghĩa ở mức 5%; NSKC: ngày sau khi cấy.

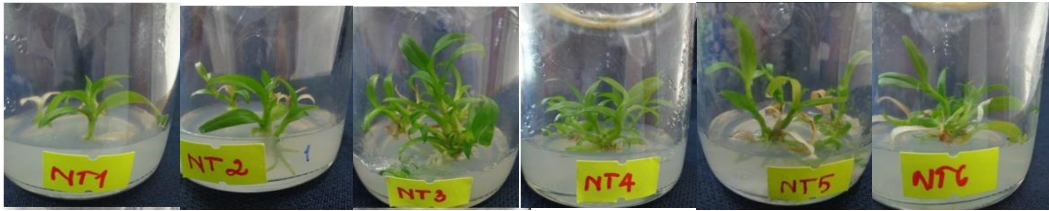
Đến thời điểm 90 NSKC, chiều cao chồi của các nghiệm thức dao động từ 1,52 cm (D₀) đến 1,97 cm (D₆). Ta thấy rằng, khi hàm lượng đường trong môi trường tăng thì chiều cao chồi cũng tăng theo (từ 1,78-1,97 cm trong môi trường MS/2) hoàn toàn tương đồng với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Quỳnh Trang và cs. (2013), khi nhân chồi *D. anosmum* sau 3 tuần chiều cao chồi tăng khi hàm lượng đường trong môi trường tăng từ 10-30 g/l.

Bên cạnh đó, số lá trung bình cũng được ghi nhận từ 4,98 lá đến 5,49 lá. Trong đó, các chồi lan ở nghiệm thức D₅ có số lá nhiều nhất (Bảng 5).

Như vậy, sau khi kết thúc thí nghiệm tạo cây hoàn chỉnh nhận thấy đường sucrose là nguồn cung cấp carbon chủ yếu cho cây và nó có vai trò quan trọng đối với việc tạo cây hoàn chỉnh của lan Giả hạc *in vitro*. Đồng thời, xác định được nghiệm thức D₃ (môi trường MS bổ sung 30 g/l đường),

D₅ (môi trường MS/2 bổ sung 20 g/l đường) và D₆ (môi trường MS/2 bổ sung 30 g/l đường) là ba môi trường thích hợp nhất để giúp mẫu lan Giả hạc *in vitro* tạo cây hoàn chỉnh. Các chồi lan Giả hạc được cấy trên ba môi trường này có đặc điểm chồi xanh tốt, to khỏe (Hình 1). Tuy nhiên, nếu xét về hiệu quả kinh tế thì có thể sử dụng môi trường có chứa khoáng MS/2 thay cho môi trường chứa khoáng MS, tương tự, giữa hàm lượng đường 20 g/l và 30 g/l thì có thể sử dụng hàm lượng 20 g/l để có thể giảm được chi phí cho môi trường nuôi cấy.

Từ đó cho thấy, lan Giả hạc *in vitro* thích ứng tốt trên môi trường MS/2. Điều này phù hợp với nhận định của Bùi Bá Bồng (1995): “Một số cây trồng thích ứng tốt hơn trong môi trường MS có nồng độ chất khoáng giảm 1/2 – 1/4”, và điều này cũng đã được ghi nhận bởi Nguyễn Thị Mỹ Duyên (2009) trên lan *Dendrobium mini* cây mô.



Hình 1. Mẫu lan Giả hạc cây mô ở thời điểm 90 NSKC

(Ghi chú: NT1: hàm lượng đường 10g/l, môi trường MS; NT2: hàm lượng đường 20g/l, môi trường MS; NT3: hàm lượng đường 30g/l, môi trường MS; NT4: hàm lượng đường 10g/l, môi trường MS/2; NT5: hàm lượng đường 20g/l, môi trường MS/2; NT6: hàm lượng đường 30g/l, môi trường MS/2)

3.5 Thí nghiệm 5: Khảo sát khả năng thích nghi của lan Giả hạc cây mô ở giai đoạn thuần dưỡng

Sau khi tạo được cây hoàn chỉnh, các cây lan Giả hạc ở từng nghiệm thức được đưa đi thuần dưỡng

để thích nghi với môi trường bên ngoài, do các cây ở nghiệm thức đối chứng D₀ vẫn chưa tạo rễ nên không được dùng làm vật liệu cho thí nghiệm 2. Kết quả tỉ lệ sống của mẫu được ghi nhận cụ thể qua Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả tỉ lệ sống (%) của lan Giả hạc cây mô ở giai đoạn thuần dưỡng

Nghiệm thức	MS + sucrose (mg/l)	10 NSKTD	20 NSKTD	30 NSKTD
D ₁	MS + 10	53,8 c	30,8 c	15,4 c
D ₂	MS + 20	93,2 ab	65,0 ab	42,3 b
D ₃	MS + 30	97,7 a	58,2 b	36,2 b
D ₄	MS/2 + 10	95,0 ab	57,5 b	34,5 b
D ₅	MS/2 + 20	82,0 b	52,3 b	38,7 b
D ₆	MS/2 + 30	94,1 ab	77,9 a	67,6 a
CV (%)		9,6	19,6	22,6
F		**	**	**

Ghi chú: Trên cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi các chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa; **: các nghiệm thức khác biệt có ý nghĩa ở mức 1%; NSKTD: ngày sau khi thuần dưỡng.

Thời điểm 10 NSKTD, nghiệm thức có tỉ lệ cây sống cao nhất là D₃ (97,7 %) và không có sự khác biệt so với các nghiệm thức D₂, D₄ và D₆ về mặt thống kê, nhưng đến thời điểm 20 NSKTD ghi nhận nghiệm thức D₆ có tỉ lệ cây sống cao nhất (77,9%), không khác biệt với nghiệm thức D₂ về mặt thống kê và có sự khác biệt so với các nghiệm thức còn lại ở mức ý nghĩa 1%. Đến thời điểm 30 NSKTD, tỉ lệ cây sống của các nghiệm thức tiếp tục giảm, dao động từ 15,4% đến 67,6%. Trong đó, nghiệm thức D₆ có tỉ lệ sống cao nhất (67,6%) và khác biệt so với các nghiệm thức còn lại ở mức ý nghĩa 1%.

Như vậy, kết thúc quá trình thuần dưỡng xác định được nghiệm thức D₆ (môi trường MS/2 bổ sung 30 g/l đường) là môi trường thích hợp giúp cây lan Giả hạc cây mô đạt tỉ lệ sống cao ở giai đoạn thuần dưỡng.

3.6 Thí nghiệm 6: Khảo sát khả năng tăng trưởng của cây lan Giả hạc cây mô trên các loại giá thể khác nhau

Ở thời điểm 30 NSKT, ghi nhận nghiệm thức E₁ có tỉ lệ sống cao nhất là 86,67%, tiếp theo là nghiệm thức E₄ (73,33%) và E₂ (66,67%) nhưng giữa ba nghiệm thức này không có sự khác biệt về mặt thống kê.

Bảng 7. Kết quả tỉ lệ sống (%) của lan Giả hạc cấy mô sau khi trồng trên các loại giá thể khác nhau

Nghiệm thức	Giá thể	30 NSKT	60 NSKT	120 NSKT
E ₁	Than	86,67 a	66,67 a	26,67 b
E ₂	Xơ dừa	66,67 abc	40,00 b	13,33 b
E ₃	Dớn nhuyễn	46,67 bc	40,00 b	20,00 b
E ₄	Than + Dớn nhuyễn	73,33 ab	73,33 a	66,67 a
E ₅	Than + Xơ dừa	40,00 c	20,00 b	–
Trung bình		62,67	48,00	31,67
F		**	**	**

Ghi chú: Trên cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi các chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa; **: khác biệt có ý nghĩa ở mức 1%; NSKT: ngày sau khi trồng, “–”: cây chết.

Đến thời điểm 120 NSKT, tỉ lệ sống trung bình giữa các nghiệm thức được ghi nhận là 31,67%. Trong đó, nghiệm thức E₄ (than + dớn nhuyễn) có tỉ lệ sống cao nhất (66,67%) và khác biệt so với các nghiệm thức khác ở mức ý nghĩa 1%, còn các cây trồng trên giá thể than + xơ dừa (E₅) chết gần như hoàn toàn ở thời điểm này.

Bên cạnh đó, loài *D.anosmum* cũng đạt tỷ lệ sống gần 100% trên giá thể là dương xỉ sau 10 ngày thuần dưỡng trong nghiên cứu của Nguyễn Quỳnh Trang và cs.(2013). Hay trong một nghiên cứu khác của Bijaya và Deepa (2012) về loài *D. primulinum* L. thuộc chi *Dendrobium* cũng đạt tỷ lệ sống khá cao khoảng 70% trên giá thể là than

kết hợp rong rêu với tỷ lệ 2:1. Điều này cho thấy, các loài thuộc chi *Dendrobium* thích nghi với nhiều loại giá thể. Tuy nhiên, tại ĐBSCL thì giá thể than + dớn nhuyễn rất dễ tìm mua và giá thành cũng rẻ.

Mặt khác, ta thấy khả năng tạo chồi và sự phát triển chiều cao chồi của các mẫu lan Giả hạc đều tăng liên tục qua 120 ngày khảo sát (Bảng 8). Trong đó, E₄ là nghiệm thức đạt số chồi nhiều nhất (2,33 chồi) đồng thời có sự phát triển chiều cao nhanh nhất (2,96 cm) tại thời điểm 120 NSKT, nhưng không khác biệt so với các nghiệm thức còn lại về chiều cao chồi.

Bảng 8. Kết quả chỉ tiêu số chồi và chiều cao chồi của lan Giả hạc cấy mô sau khi trồng trên các loại giá thể khác nhau

Nghiệm thức	Giá thể	30 NSKT		60 NSKT		120 NSKT	
		SC	CC	SC	CC	SC	CC
E ₁	Than	1,35 a	1,35 c	1,78	1,68	2,17 a	2,58
E ₂	Xơ dừa	0,92 b	0,61 d	1,33	1,20	1,47 ab	2,67
E ₃	Dớn nhuyễn	0,83 b	2,08 b	1,00	2,13	1,17 b	2,35
E ₄	Than + Dớn nhuyễn	1,53 a	2,53 a	1,64	2,66	2,33 a	2,96
E ₅	Than + Xơ dừa	0,67 b	0,74 d	1,00	1,53	–	–
Trung bình		20,3	16,5	39,9	37,9	32,6	23,0
F		*	**	ns	ns	*	ns

Ghi chú: Trên cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi các chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa; ns: không khác biệt ý nghĩa thống kê, *: khác biệt có ý nghĩa ở mức 5%, **: khác biệt có ý nghĩa ở mức 1%; SC: số chồi, CC: chiều cao chồi.

Đối với chỉ tiêu số lá, các chồi có số lá phát triển và tăng liên tục qua các thời điểm 30, 60 và 120 NSKT. Tại thời điểm 120 NSKT, số lá trung bình ở các nghiệm thức dao động từ 2,83 đến 3,72 lá. Trong đó, E₃ là nghiệm thức tạo số lá nhiều nhất (3,72 lá), kế đến là nghiệm thức E₄ (3,64 lá)

nhưng sự khác biệt giữa các nghiệm thức ở thời điểm này không có ý nghĩa về mặt thống kê (Bảng 9). Bên cạnh đó, nghiệm thức E₄ cũng được ghi nhận là có khả năng tăng trưởng chiều dài lá dài nhất với chiều dài trung bình 2,40 cm.

Bảng 9. Kết quả chỉ tiêu số lá và chiều dài lá của lan Giả hạc cấy mô sau khi trồng trên các loại giá thể khác nhau

Nghiệm thức	Số lá			Chiều dài lá		
	30 NSKT	60 NSKT	120 NSKT	30 NSKT	60 NSKT	120 NSKT
E ₁	1,89 b	2,17 abc	3,25	1,30 bc	1,31 bc	1,90
E ₂	1,08 c	1,17 c	2,83	0,73 cd	0,80 c	2,13
E ₃	2,67 a	3,50 a	3,72	1,72 b	1,87 ab	2,30
E ₄	3,19 a	3,25 ab	3,64	2,30 a	2,38 a	2,40
E ₅	0,89 c	1,89 bc	–	0,51 d	1,07 bc	–
CV (%)	20,8	33,8	22,1	24,4	33,0	23,1
F	**	*	ns	**	*	ns

Ghi chú: Trên cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi các chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa, **: các nghiệm thức khác biệt có ý nghĩa ở mức 1%, *: các nghiệm thức khác biệt có ý nghĩa ở mức 5%.

Từ kết quả phân tích trên ta thấy, nghiệm thức E₄ với giá thể trồng là than + dớn nhuyễn giúp cho cây lan Giả hạc cấy mô có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt nhất, đạt tỉ lệ sống cao (66,67%), những cây lan Giả hạc được trồng trên giá thể này có đặc điểm thân to, lá màu xanh đậm, này chồi khỏe (Hình 2). Tuy nhiên, không phải bất kỳ loại

lan *Dendrobium* nào cũng thích hợp trồng trên giá thể than + dớn nhuyễn, điển hình đối với lan cấy mô *Dendrobium mini* ở giai đoạn đầu nuôi trồng (từ cây mới ra mô đến khi cây được 7,5 tháng tuổi) giá thể thích hợp là dớn và dứa miếng (Nguyễn Thị Mỹ Duyên, 2009).



Hình 2. Các cây lan Giả hạc cấy mô được trồng trên giá thể than (A), xơ dừa (B), dớn nhuyễn (C) và than + dớn nhuyễn (D) ở thời điểm 120 NSKT

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu quy trình vi nhân giống lan Giả hạc cho thấy: hạt nảy mầm tốt trên môi trường MS + 1 mg/l BA + 0,2 mg/l NAA hoặc MS + 1 mg/l NAA với tỷ lệ nảy mầm $\geq 85\%$ ở 90 NSKG. Môi trường thích hợp cho giai đoạn nhân nhanh chồi là môi trường MS có BA ở nồng độ 1 mg/l và 2 mg/l

với kiểu cấy cắt chồi thành từng đoạn trên môi trường 0,5mg/l NAA + 3 mg/l BA tạo được 12,50 chồi sau 12 tuần nuôi cấy. Ba môi trường thích hợp nhất để giúp mẫu lan Giả hạc *in vitro* tạo cây hoàn chỉnh là nghiệm thức D₃ (môi trường MS + 30g/l đường), D₅ (môi trường MS/2 + 20g/l đường) và D₆ (môi trường MS/2 + 30g/l đường). Đồng thời, nghiệm thức D₆ (môi trường MS/2 +

30 g/l đường) là môi trường thích hợp giúp cho lan Giả hạc cấy mô tạo cây hoàn chỉnh và đạt tỉ lệ sống cao (67,60%) trong vườn ươm giai đoạn thuần dưỡng. Bên cạnh đó, cây đạt tỉ lệ sống cao nhất (66,67%) và có khả năng sinh trưởng, phát triển tốt trên giá thể than + dớn nhuyễn.

Mặt khác, để kết quả đề tài được triển khai nhân rộng sản xuất, cần tiếp tục nghiên cứu khả năng sinh trưởng và phát triển của những cây lan này tại một số địa bàn trồng lan trong tỉnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bijaya Pant. & Deepa Thapa. (2012). In vitro mass propagation of an epiphytic orchid, *Dendrobium primulinum* Lindl. through shoot tip culture. *African Journal of Biotechnology*, 11, 9970-9974.
- Bùi Bá Bồng. (1995). *Nhân giống cây bằng nuôi cấy mô*. An Giang: Sở Khoa Học và Công Nghệ Môi Trường An Giang.
- Nguyễn Thị Mỹ Duyên. (2009). Nhân giống *Dendrobium anosmum*, *Dendrobium mini* bằng phương pháp nuôi cấy mô. Nghiên cứu các loại giá thể trồng lan *Dendrobium mini* thích hợp và cho hiệu quả cao. Đề tài nghiên cứu khoa học. Khoa Nông nghiệp – Tài nguyên thiên nhiên, Trường Đại học An Giang.
- Nguyễn Quỳnh Trang., Vũ Thị Huệ., Khuất Thị Hải Ninh. & Nguyễn Thị Thơ. (2013). Nhân giống *in vitro* lan Phi điệp tím (*Dendrobium anosmum*). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, 3, 16-21.
- Phan Thúc Huân. (2005). *Hoa lan nuôi trồng và kinh doanh*. Thành phố Hồ Chí Minh: Nhà xuất bản Phương Đông.
- Trần Văn Bảo. (1999). *Kỹ thuật nuôi trồng Phong lan*. Thành phố Hồ Chí Minh: Nhà xuất bản Trẻ.