

Vi nhân giống và ra vườn ươm cây lan nấng *Dendrobium caesar*

Phạm Minh Quang, Dương Công Kiên, Quách Ngô Diễm Phương, Hoàng Thị Thanh Minh

Tóm tắt—Hoa lan hiện nay được trồng và kinh doanh chủ yếu là *Dendrobium*, *Phalaenopsis*, *Cattleya*, *Oncidium*... Trong đó, *Dendrobium* là một trong những loài lan được ưa chuộng và tiêu thụ mạnh hiện nay. Vì vậy, chúng tôi nghiên cứu vi nhân giống và đưa ra vườn ươm hoa lan nấng *Dendrobium caesar* nhằm tạo nguồn giống cho thị trường hoa Việt Nam. Khử trùng mẫu chồi con (keiki) với dung dịch sodium hypochlorite 2,5% trong 15 phút là tốt nhất. Tác động của cytokinin (TDZ, BA, Kinetin), tiền chất của cytokinin - adenine và auxin (IAA, IBA, NAA) được khảo sát trong cảm ứng tạo chồi và rễ ở các nồng độ khác nhau. Chồi được hình thành nhiều nhất trên môi trường Knudson C (KC) bổ sung BA 2,0 mg/L. Rễ được cảm ứng trong môi trường KC bổ sung 0,5 g/L than hoạt tính (AC) và 1,0 mg/L IAA. Cây con *in vitro* 1 tháng được đưa ra vườn ươm có tỷ lệ sống cao nhất trên giá thể vỏ dừa chẻ nhỏ. Giá thể tốt nhất cho sự sinh trưởng của lan *Dendrobium caesar* là vỏ đậu phộng. Như vậy, chúng tôi đã tạo thành công cây lan nấng bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro* và xác định giá thể thích hợp cho sự sinh trưởng của lan *Dendrobium caesar* trong vườn ươm.

Từ khóa—*Dendrobium caesar*, nuôi cấy *in vitro*, ra vườn ươm, vi nhân giống

1. MỞ ĐẦU

Dendrobium (Orchidaceae, Epidendoideae) là một trong những chi lớn nhất trong nhóm thực vật có hoa, với hơn 1500 loài hiện đang được mô tả và được xem như là thực vật biểu sinh ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới châu Á và Đông Úc [1].

Ở Việt Nam, *Dendrobium* có đến 100 loài, xếp trong 14 tông, được phân biệt bằng thân (giá hành), lá và hoa [2]. Đào Thị Thanh Vân và Đặng Thị Tố Nga (2008) đã chỉ ra ở Việt Nam có 107

loài, phân bố ở các vùng núi từ Bắc vào Nam và trên một số đảo ven biển. Tuy nhiên, do nhiều nguyên nhân khác nhau, đến nay nhiều loài đã bị tuyệt chủng hoặc bị đe dọa tuyệt chủng. Một số loài nằm trong danh lục đỏ của “Sách đỏ Việt Nam” [3].

Dendrobium là chi lan phổ biến trong lĩnh vực công nghiệp hoa cắt cành và một giả hành có thể cho rất nhiều hoa. Hầu như toàn bộ các loài thuộc chi *Dendrobium* là những loài có hoa lâu tàn, thời gian nở trung bình từ 1–2 tháng, cá biệt có loài đến 3 tháng, hoặc có thể nở hoa quanh năm bởi các chồi hoa mới luôn luôn thay thế các chồi hoa cũ như các giống *Dendrobium caesar alba*, *Dendrobium caesar latin*...Tuy nhiên cũng có loài hoa nhanh tàn như lan thạch học, chỉ nở trong vòng 24 giờ [4].

Hoa lan hiện nay được trồng và kinh doanh chủ yếu là *Dendrobium*, *Phalaenopsis*, *Cattleya*, *Oncidium*... Trong đó, *Dendrobium* là loại hoa được trồng nhiều nhất, đặc biệt ở Thái Lan. *Dendrobium* hấp dẫn người tiêu dùng bởi màu sắc, độ bền hoa, dễ trồng và đặc biệt có giá trị kinh tế cao, cho thu nhập lớn đối với ngành trồng hoa trong và ngoài nước. Song song với việc sưu tập, nhập nội, nhân nhanh các giống lan thì việc nghiên cứu hoàn thiện công nghệ phát triển một số giống nhập nội cũng là nhiệm vụ cấp bách của các nhà khoa học để phục vụ sản xuất [4]. Vì vậy, chúng tôi tiến hành khảo sát quy trình vi nhân giống và đưa ra vườn ươm hoa lan nấng *Dendrobium caesar* nhằm tạo nguồn giống cho thị trường hoa.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Cây hoa lan *Dendrobium caesar* với 6 cánh hoa gồm 3 cánh đài và 3 cánh tràng, cánh hoa có màu tím hồng ở viền cánh và màu trắng trong cùng;

Ngày nhận bản thảo: 07-01-2017, ngày chấp nhận đăng: 15-05-2018, ngày đăng: 12-09-2018

Tác giả: Phạm Minh Quang, Dương Công Kiên, Quách Ngô Diễm Phương, Hoàng Thị Thanh Minh - Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM – httminh@hcmus.edu.vn

mua từ Công ty Trách nhiệm Hữu hạn Thương mại Dịch vụ hoa lan Hoàng Giáp.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy *in vitro*: Môi trường nền là môi trường khoáng đa lượng và vi lượng theo Knudson C (KC) bổ sung 100 mg/L nước dừa, 50 mg/L myo-inositol, vitamin theo Morel, 20 g/L sucrose và chất điều hòa sinh trưởng thực vật thay đổi theo từng nghiệm thức. Môi trường được chỉnh pH 5,8 trước khi hấp khử trùng ở 1 atm, 121°C trong 25 phút. Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày. Cường độ chiếu sáng trung bình $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Điều kiện nuôi cấy ở vườn ươm: khu vực ươm được phủ bằng lưới, nhiệt độ ngày đêm dao động từ 25 - 35°C. Khu vực ươm cây được vệ sinh sạch sẽ, xử lý đất nền bằng thuốc khử trùng Benkona để hạn chế nấm mốc, vi khuẩn và được tưới phun sương bằng nước sạch 2 lần/ngày. Đối với cây con ra vườn: cây *Dendrobium caesar in vitro* đã ra rễ 2 tháng tuổi được đưa ra vườn ươm, sử dụng chậu là ly nhựa trong thể tích 350 mL có đục lỗ ở đáy; được tưới phun sương 80 mL nước/lần/10 chậu; không bón phân. Đối với cây khảo sát tăng trưởng: cây *Dendrobium caesar* 4 tháng tuổi được tưới phun 80 mL nước/lần/chậu, sử dụng loại chậu đen có kích thước 14 cm x 15 cm; bón N-P-K:16-16-8: 1 lần/tuần.

Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1: Khảo sát thời gian khử trùng bề mặt mẫu cây bằng dung dịch sodium hypochlorite 2,5%.

Mẫu keiki của lan được lắc trong dung dịch sodium hypochlorite 2,5% trong các khoảng thời gian 10 phút, 15 phút và 20 phút. Sau đó được rửa sạch bằng nước cất vô trùng, tia bỏ phần mô tổn thương và cấy trên môi trường nền không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật trong 1 tuần.

Thí nghiệm 2: Khảo sát khả năng cảm ứng tạo chồi lan *Dendrobium caesar* của các loại cytokinin và tiền chất.

3 cytokinin (BA, Kinetin và TDZ) và adenine được sử dụng riêng lẻ trong thí nghiệm. Môi trường khảo sát là môi trường nền không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật (môi trường đối chứng) và môi trường nền bổ sung BA, kinetin, adenine và TDZ riêng lẻ cùng ở nồng độ 1,0 mg/L.

Cây con *in vitro* sẽ được hủy đỉnh và chuyển lên môi trường nuôi cấy, sau 4 tuần ghi nhận các chỉ tiêu như số chồi mới hình thành, đường kính và chiều cao chồi.

Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của các nồng độ cytokinin khác nhau lên khả năng nhân nhanh chồi lan *Dendrobium caesar*.

Cytokinin được chọn là cytokinin có khả năng cảm ứng tạo chồi tốt nhất (kết quả từ thí nghiệm 2) và khảo sát ở các nồng độ khác nhau. Môi trường khảo sát là môi trường nền không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật (môi trường đối chứng) và bổ sung cytokinin riêng lẻ ở các nồng độ 0,5 mg/L; 1,0 mg/L; 1,5 mg/L; 2,0 mg/L; 2,5 mg/L và 3,0 mg/L.

Thí nghiệm 4: Khảo sát tác động của auxin lên khả năng cảm ứng tạo rễ chồi lan *Dendrobium caesar*

Môi trường khảo sát là môi trường nền không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật (môi trường đối chứng) và môi trường nền bổ sung IAA, IBA, NAA riêng rẽ ở các nồng độ 0,5 mg/L; 1,0 mg/L; 1,5 mg/L và 2,0 mg/L. Môi trường nuôi cấy được bổ sung thêm than hoạt tính (AC) 0,5 g/L.

Thí nghiệm 5: Khảo sát ảnh hưởng của các loại giá thể khác nhau lên tỷ lệ sống của cây con lan *Dendrobium caesar in vitro* ra vườn ươm

Cây lan *Dendrobium caesar in vitro* sau khi ra rễ khoảng 1 tháng được chuyển ra các giá thể vỏ dừa, dớn trắng và than củi đập nhỏ đã được xử lý để loại bỏ tạp chất và hấp vô trùng. Cây con được nuôi trong nhà ươm, tưới phun sương bằng nước sạch 2 lần/ngày, 80 mL nước/lần/10 chậu; không bón phân. Khảo sát tỷ lệ sống của cây con trong 6 tuần.

Thí nghiệm 6: Khảo sát ảnh hưởng của các loại giá thể khác nhau lên sự sinh trưởng của lan *Dendrobium caesar* trong vườn ươm.

Cây con 4 tháng tuổi sẽ được trồng trên các giá thể khác nhau: than củi đập nhỏ, vỏ dừa, dớn trắng và vỏ đậu phộng đã được xử lý để loại bỏ tạp chất để khảo sát các chỉ tiêu tăng trưởng: số rễ mới hình thành, chiều dài rễ, chiều dài lá... Tưới phun sương bằng nước sạch 2 lần/ngày, 80 mL/lần/chậu. Phân bón lá tưới phun 1 lần/tuần sử dụng loại phân bón N-P-K:16-16-8. Kết quả được quan sát và ghi nhận sau 6 tuần.

Phân tích và xử lý số liệu: Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần. Kết quả được xử lý thống kê bằng phương pháp phân tích ANOVA một chiều trong chương trình.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát thời gian khử trùng bề mặt mẫu cây bằng dung dịch sodium hypochlorite 2,5%

Trong nghiên cứu này, keiki được chọn làm nguồn tạo mẫu ban đầu để đảm bảo tính ổn định về

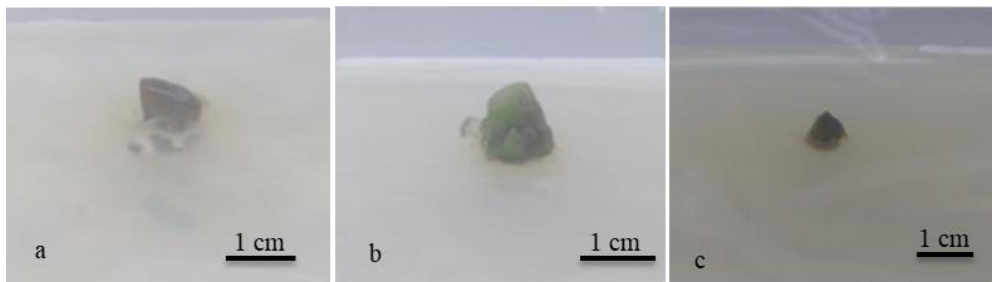
mặt di truyền, tránh các biến dị do sự tổ hợp lại nhiễm sắc thể trong quá trình thụ tinh. Ở hầu hết các giống lan rất dễ xảy ra biến dị vì thế việc gieo hạt không thể tạo ra được một lượng lớn cây con có tính đồng nhất [5].

Kết quả khử trùng bề mặt mẫu keiki lan *Dendrobium ceasar* bằng dung dịch sodium hypochlorite 2,5% ở các khoảng thời gian 10 phút, 15 phút và 20 phút được trình bày trong Bảng 1 và Hình 1.

Bảng 1. Kết quả khảo sát thời gian khử trùng bề mặt mẫu với dung dịch sodium hypochlorite 2,5%

Thời gian khử mẫu (phút)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu úng (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)
10	92,260 ± 2,334 ^c	0,000 ^a	7,740 ± 2,334 ^a
15	39,598 ± 0,952 ^b	0,000 ^a	60,402 ± 0,952 ^c
20	20,630 ± 1,584 ^a	47,127 ± 5,609 ^b	32,243 ± 4,510 ^b

Các số trung bình trong các cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt ở mức $p < 0,05$

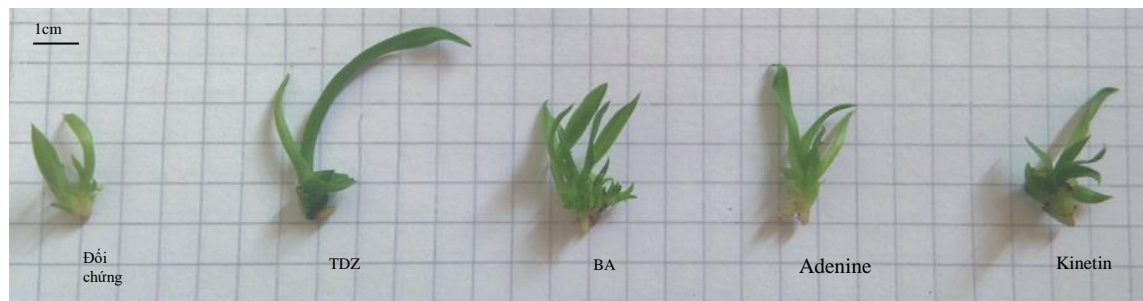


Hình 1. Mẫu được khử trùng sau 1 tuần nuôi cấy trên môi trường KC. Mẫu cây được khử trùng bề mặt trong 10 phút (a), 15 phút (b), 20 phút (c)

Bảng 2. Kết quả cảm ứng tạo chồi của các loại cytokinin và adenine sau 4 tuần nuôi cấy

Cytokinin và tiền chất	Số chồi trung bình/mẫu cây	Đường kính chồi trung bình (mm)	Chiều cao chồi trung bình (mm)
Đối chứng	1,163 ± 0,037 ^a	1,371 ± 0,042 ^b	5,990 ± 0,156 ^a
TDZ	1,593 ± 0,092 ^{ab}	1,834 ± 0,068 ^c	20,772 ± 0,215 ^c
BA	4,356 ± 0,240^c	1,084 ± 0,064^a	8,115 ± 0,193^b
Adenine	1,468 ± 0,095 ^{ab}	1,175 ± 0,068 ^{ab}	17,650 ± 0,092 ^d
Kinetin	1,862 ± 0,096 ^b	2,515 ± 0,143 ^d	11,323 ± 0,199 ^c

Các số trung bình trong các cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt ở mức $p < 0,05$



Hình 2. Ảnh hưởng của cytokinin và adenine lên sự cảm ứng tạo chồi sau 4 tuần nuôi cấy

Trong quá trình khử trùng, các mẫu cấy được xử lý bằng tác nhân khử trùng với thời gian thích hợp để tạo nguồn mẫu *in vitro*. Trong thí nghiệm này, mẫu keiki được xử lý với sodium hypochloride 2,5% trong 10 phút, không đủ thời gian để sodium hypochloride tiêu diệt hoàn toàn vi sinh vật dẫn đến tỉ lệ mẫu nhiễm cao ($92,260 \pm 2,334\%$). Thời gian xử lý 20 phút, dung dịch sodium hypochloride làm tổn thương lên tế bào và mô của mẫu cấy; dẫn đến mẫu cấy bị úng và tỉ lệ mẫu sống thấp. Như vậy, kết quả khử trùng tốt nhất 15 phút với tỷ lệ mẫu cấy nhiễm khuẩn là $39,598 \pm 0,952\%$, không có mẫu úng và tỷ lệ mẫu sống là $60,402 \pm 0,952\%$. Thời gian xử lý mẫu 15 phút đủ để dung dịch sodium hypochlorite tác động lên toàn bộ bề mặt mẫu cấy và làm tổn thương mẫu cấy ít nhất. Ngoài ra, nguồn gốc và bộ phận mẫu cấy cũng đóng vai trò quan trọng trong quá trình khử trùng [6].

Khảo sát khả năng cảm ứng tạo chồi lan *Dendrobium caesar* bởi cytokinin và tiền chất của cytokinin

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các loại cytokinin khác nhau và adenine ở nồng độ 1 mg/L lên sự cảm ứng tạo chồi được trình bày trong Bảng 2 và Hình 2.

Môi trường bổ sung BA 1,0 mg/L cho số chồi cao nhất là $4,356 \pm 0,240$ chồi/mẫu cấy; tuy nhiên lại có chiều cao chồi thấp nhất $8,115 \pm 0,193$ mm. Madhuvà cộng sự (2012) cũng đã ghi nhận hiệu quả cao của BA riêng lẻ trong sự cảm ứng tạo chồi trực tiếp từ mẫu cấy các loài *Dendrobium* [7].

Kết quả của thí nghiệm cho thấy khả năng cảm ứng tạo chồi và kéo dài chồi của kinetin thấp với số chồi tạo ra là $1,862 \pm 0,096$ chồi/ mẫu cấy và chiều cao trung bình của chồi là $11,323 \pm 0,199$ mm. Nghiên cứu của Martin và cộng sự (2006) trên *Dendrobium* cho thấy môi trường MS bổ sung $6,97 \mu\text{M}$ kinetin đã cảm ứng tạo 5 chồi từ một chồi và môi trường bổ sung $44,4 \mu\text{M}$ BA tạo hơn 6 Protocorm-like-bodies (PLBs) sau 60 ngày nuôi cấy [8]. Trong nghiên cứu của Paek và Yeung (1991) trên lan *Cymbidium forrestii* và nghiên cứu của Sheelavantmath và cộng sự (2000) trên lan *Geodorum densiflorum* cho thấy khoảng 95% mẫu cấy đáp ứng hình thành chồi trên môi trường bổ sung $44,4 \mu\text{M}$ BA so với môi trường bổ sung $46,4 \mu\text{M}$ kinetin [9]. TDZ có khả năng cảm ứng tạo chồi nhanh và chồi cao nhất, chồi có màu xanh đậm nhưng không tạo được nhiều chồi. Mặt khác,

TDZ có giá thành cao hơn BA nên không hiệu quả về mặt kinh tế. Adenine không có hiệu quả trong việc cảm ứng hình thành chồi ở lan *Dendrobium caesar*. Dựa trên kết quả đạt được, môi trường bổ sung BA được sử dụng trong thí nghiệm nhân nhanh chồi lan *Dendrobium caesar*.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ BA lên sự nhân nhanh chồi lan *Dendrobium caesar*

Môi trường KC bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau cho các kết quả khác nhau trong sự tạo cụm chồi sau 4 tuần nuôi cấy được trình bày trong bảng 3 và hình 3.

Bảng 3. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ BA trong nhân nhanh chồi lan nấng *Dendrobium caesar* sau 4 tuần

Nồng độ BA (mg/L)	Số chồi trung bình/mẫu cấy	Đường kính chồi trung bình (mm)	Chiều cao chồi trung bình (mm)
0,0	$4,173 \pm 0,167^a$	$1,820 \pm 0,077^{bc}$	$17,256 \pm 0,164^d$
0,5	$8,178 \pm 0,154^c$	$1,045 \pm 0,123^a$	$8,801 \pm 0,068^b$
1,0	$7,152 \pm 0,096^b$	$1,207 \pm 0,100^a$	$13,073 \pm 0,101^c$
1,5	$11,987 \pm 0,116^f$	$1,969 \pm 0,828^c$	$22,860 \pm 0,182^e$
2,0	$15,239 \pm 0,278^e$	$2,500 \pm 0,151^d$	$20,086 \pm 0,145^f$
2,5	$8,765 \pm 0,105^d$	$1,632 \pm 0,091^b$	$18,993 \pm 0,120^e$
3,0	$10,048 \pm 0,134^e$	$1,027 \pm 0,050^a$	$6,772 \pm 0,069^a$

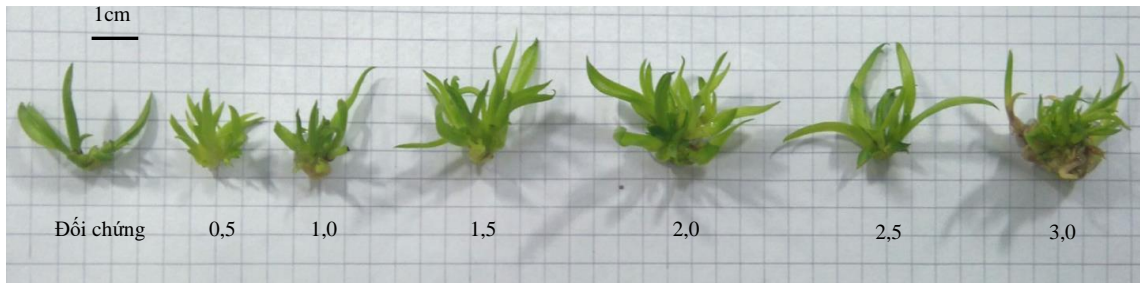
Các số trung bình trong các cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt ở mức $p < 0,05$

Ở các nồng độ BA từ 0,5 mg/L đến 2,0 mg/L, số chồi hình thành từ một mẫu cấy ban đầu tăng dần, cụm chồi tăng trưởng khỏe mạnh. Môi trường bổ sung BA 2,0 mg/L tạo nhiều chồi nhất với số chồi hình thành là $15,239 \pm 0,278$ chồi/mẫu cấy, đường kính chồi và chiều cao chồi lần lượt là $2,500 \pm 0,1512$ mm và $20,086 \pm 0,145$ mm. Chồi mập có kích thước đồng đều, màu sắc xanh đều, chồi khỏe và không bị thủy tinh thể. Môi trường bổ sung BA 3,0 mg/L có chồi chết nhiều, chồi nhỏ và yếu; đường kính chồi $1,027 \pm 0,050$ mm và chiều cao chồi $6,772 \pm 0,069$ mm. Trong môi trường bổ sung BA 3,0 mg/L, chồi chuyển sang màu nâu và chết từ tuần thứ 2, chồi còn sống bị hiện tượng thủy tinh thể, màu sắc nhạt và trong. Như vậy, việc nuôi cấy *in vitro* cây lan nấng *Dendrobium caesar*

trên môi trường bổ sung BA ở nồng độ cao sẽ ức chế sự tạo chồi, chồi tạo ra không khỏe và bị thủy tinh thể (Hình 3).

Kết quả này cũng tương tự kết quả của Phạm Thị Liên (2010) trên lan *Dendrobium* cũng cho thấy, trên môi trường không bổ sung BA, hệ số nhân là 1,48, khi tăng nồng độ BA lên 0,5 mg/L hệ số nhân đạt 1,67 và tiếp tục tăng nồng độ BA lên 1,5 mg/L hệ số nhân tăng 3,82 lần. Khi tăng nồng

độ BA lên 2,0 mg/L thì hệ số nhân chồi không những không tăng mà có xu hướng giảm dần. Tiếp tục tăng nồng độ lên tới 2,5mg/L và 3,0 mg/L thì hệ số nhân chồi giảm xuống lần lượt còn 1,79 và 1,37, thấp hơn so với môi trường không được bổ sung BA. Ngoài ra, chất lượng chồi được tạo ra trên 2 môi trường này cũng kém, chồi bị thủy tinh thể, mọng nước, lá xanh nhạt và cây yếu [4].



Hình 3. Mẫu cây trên môi trường bổ sung BA ở các nồng độ (mg/L) khác nhau sau 4 tuần nuôi cấy

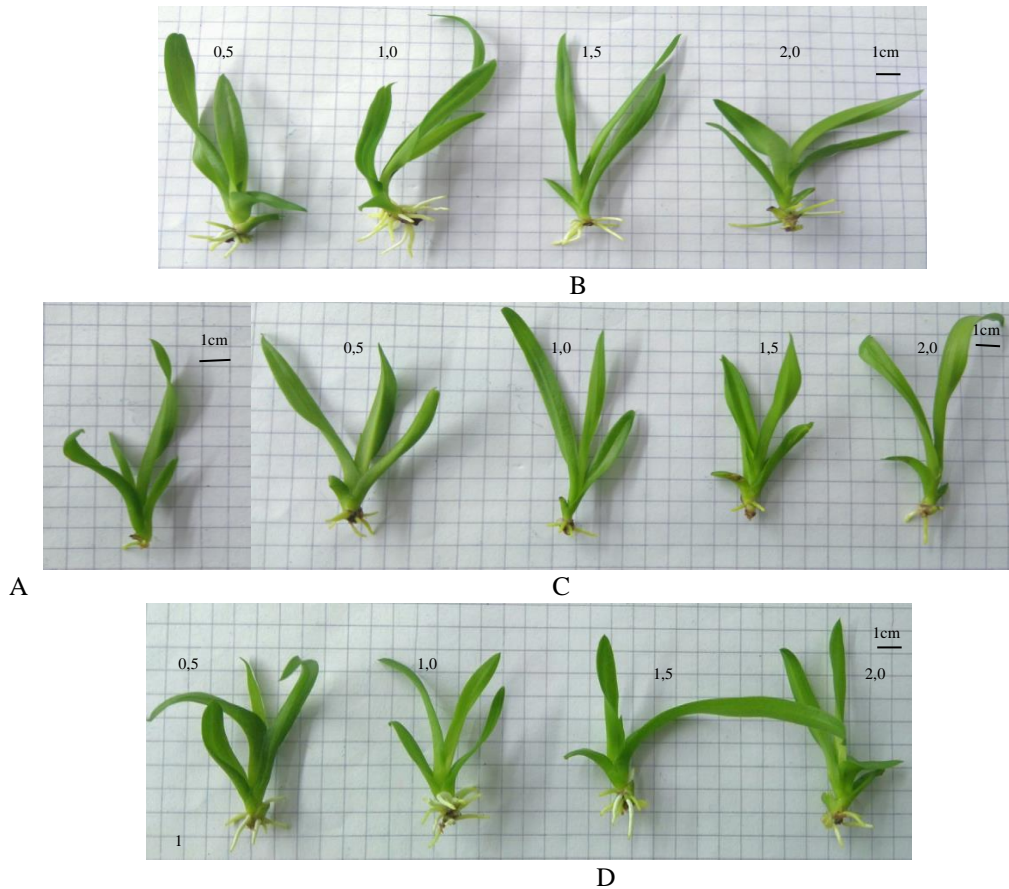
Khảo sát tác động của auxin lên khả năng cảm ứng tạo rễ chồi lan *Dendrobium caesar*

Sau 4 tuần nuôi cấy tác động của 3 loại auxin riêng lẻ ở các nồng độ khác nhau được trình bày trong Bảng 4 và Hình 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát 3 loại auxin trong cảm ứng tạo rễ chồi lan *Dendrobium caesar* sau 4 tuần

Auxin (mg/L)	Số rễ trung bình/mẫu cây	Đường kính rễ trung bình (mm)	Chiều dài rễ trung bình (mm)
Đối chứng	2,219 ± 0,158 ^a	0,768 ± 0,926 ^{abcd}	3,273 ± 0,099 ^b
IAA 0,5	8,592 ± 0,136 ^f	1,121 ± 0,077 ^d	8,886 ± 0,115 ^f
IAA 1,0	15,186 ± 0,116^f	1,043 ± 0,036 ^{cd}	10,890 ± 0,064 ^g
IAA 1,5	9,438 ± 0,079 ^g	0,786 ± 0,063 ^{abcd}	8,623 ± 0,150 ^f
IAA 2,0	3,969 ± 0,070 ^c	0,594 ± 0,101 ^{ab}	11,757 ± 0,099 ^h
IBA 0,5	6,261 ± 0,266 ^e	0,729 ± 0,075 ^{abc}	4,483 ± 0,103 ^c
IBA 1,0	5,062 ± 0,120 ^d	0,656 ± 0,105 ^{ab}	3,371 ± 0,306 ^b
IBA 1,5	2,316 ± 0,145 ^a	0,597 ± 0,050 ^{ab}	2,249 ± 0,150 ^a
IBA 2,0	3,125 ± 0,226 ^b	0,480 ± 0,051 ^a	5,325 ± 0,278 ^d
NAA 0,5	5,530 ± 0,120 ^d	0,940 ± 0,058 ^{bcd}	5,406 ± 0,240 ^d
NAA 1,0	10,016 ± 0,131 ^h	0,902 ± 0,006 ^{bcd}	8,632 ± 0,117 ^f
NAA 1,5	9,296 ± 0,365 ^g	1,090 ± 0,307 ^{cd}	6,261 ± 0,185 ^e
NAA 2,0	4,109 ± 0,0686 ^c	0,805 ± 0,050 ^{abcd}	4,133 ± 0,138 ^c

Các số trung bình trong các cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt ở mức $p < 0,05$



Hình 4. Mẫu cây trên môi trường cảm ứng tạo rễ sau 4 tuần nuôi cấy
A. Đối chứng, B. IAA ở các nồng độ khác nhau (mg/L), C. IBA ở các nồng độ khác nhau (mg/L),
D. NAA ở các nồng độ khác nhau (mg/L)

Khảo sát ảnh hưởng của các loại giá thể khác nhau lên tỷ lệ sống của cây con lan *Dendrobium caesar in vitro* ra vườn ươm

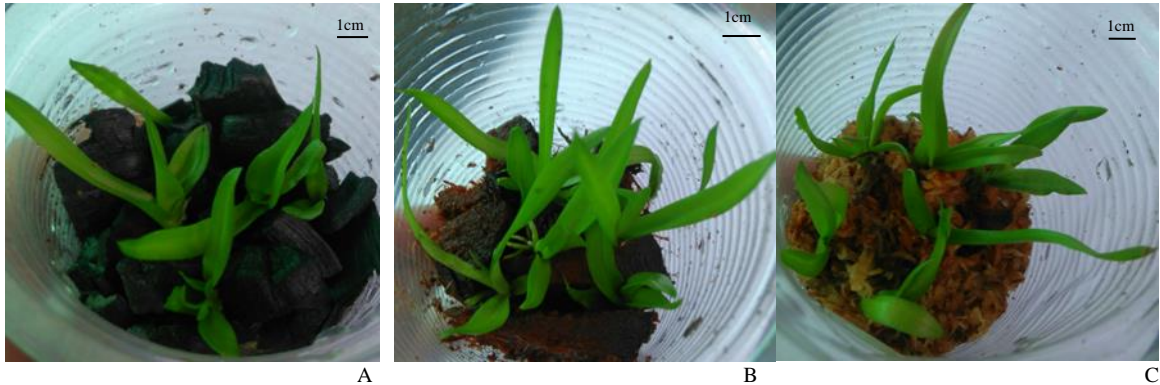
Ảnh hưởng của các giá thể lên khả năng sống sót của cây con được chuyển từ nuôi cấy *in vitro* ra vườn ươm được ghi nhận sau 6 tuần được trình bày trong Bảng 5 và Hình 5. Tỷ lệ cây con sống sót trên giá thể than củi đập nhỏ thấp nhất ($8,952 \pm 0,282\%$). Than củi đập nhỏ giữ nước kém. Đây là nguyên nhân dẫn đến cây con chết nhiều do thiếu nước. Tỷ lệ sống của cây con đưa ra vườn ươm trên giá thể dớn trắng là $38,708 \pm 0,946\%$. Dớn trắng giữ nước quá nhiều dẫn đến rễ cây lan con *Dendrobium* bị úng [2]. Trên giá thể vỏ dừa chẻ nhỏ, có số lượng cây con sống đạt $88,863 \pm$

$0,919\%$, có thể do vỏ dừa chẻ nhỏ giữ nước ở mức trung bình, thích hợp nhất để trồng cây con khi được chuyển từ phòng nuôi cấy *in vitro* ra vườn ươm. Vì vậy, trong 3 loại giá thể, vỏ dừa chẻ nhỏ là giá thể tốt nhất để chuyển cây con *in vitro* ra vườn ươm.

Bảng 5. Ảnh hưởng của các loại giá thể lên tỷ lệ cây sống của cây con ra vườn ươm ghi nhận sau 6 tuần

Loại giá thể	Tỷ lệ cây sống (%)
Than củi đập nhỏ	$8,952 \pm 0,282^a$
Vỏ dừa chẻ nhỏ	$88,863 \pm 0,919^c$
Dớn trắng	$38,708 \pm 0,946^b$

Các số trung bình trong các cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt ở mức $p < 0,05$



Hình 5. Cây con in vitro chuyển ra vườn ươm sau 6 tuần.

Giá thể than củi đập nhỏ (A), giá thể vỏ dừa chẻ nhỏ (B), giá thể dớn trắng (C)

Khảo sát ảnh hưởng của các loại giá thể khác nhau lên sự sinh trưởng của lan *Dendrobium caesar* trong vườn ươm.

Kết quả về sự sinh trưởng của cây con lan *Dendrobium caesar* ghi nhận sau 6 tuần được thể hiện trong Bảng 6.

Hệ thống rễ của cây lan con sống trên giá thể vỏ đậu phộng có số rễ mới hình thành, chiều dài rễ và đường kính rễ cao nhất, lần lượt là $15,058 \pm 0,091$ rễ, $140,234 \pm 0,196$ mm và $2,520 \pm 0,036$ mm, tiếp đến là than củi đập nhỏ và thấp nhất là dớn trắng. Sự phát triển của cây trên giá thể vỏ đậu phộng tạo ra số giá hành mới nhiều nhất $2,031 \pm 0,044$ và cao nhất $170,367 \pm 0,814$ mm, lá trên giá hành mới xanh đậm. Tuy nhiên, cây phát triển trên giá thể

than củi đập nhỏ có giá hành có đường kính lớn nhất là $18,236 \pm 0,257$ mm.

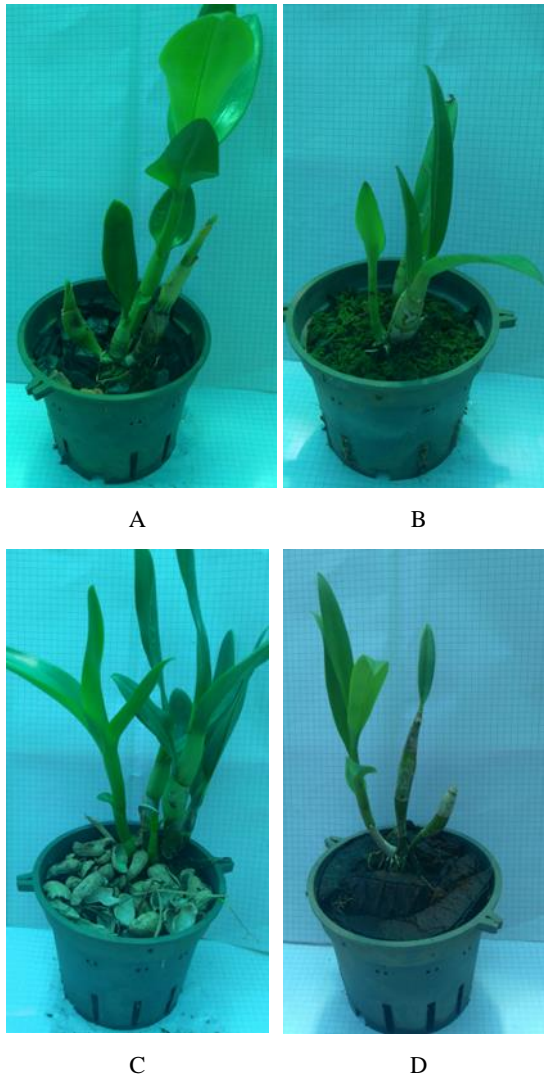
Số lá rụng nhiều nhất là trên giá thể dớn trắng với $4,076 \pm 0,048$ lá; chiều dài lá và chiều rộng lá lớn nhất quan sát được ở cây trên giá thể vỏ đậu phộng lần lượt là $188,710 \pm 0,946$ mm và $44,574 \pm 0,681$ mm. Nhưng số lá mới hình thành nhiều nhất lại quan sát được ở cây trên giá thể than củi đập nhỏ là $6,571 \pm 0,139$ lá.

Bề mặt các giá thể vỏ dừa chẻ nhỏ và dớn trắng khá ẩm, màu sắc bị sậm lại theo thời gian, xuất hiện nhiều rêu và nấm mốc. Trong khi đó giá thể than củi đập nhỏ và vỏ đậu phộng thì khô hơn và không có sự xuất hiện của rêu và nấm mốc.

Bảng 6. Kết quả khảo sát sự sinh trưởng của cây con sau 6 tuần tiếp theo trong vườn ươm

Giá thể	Than củi đập nhỏ	Vỏ dừa chẻ nhỏ	Dớn trắng	Vỏ đậu phộng
Số lá rụng	$1,100 \pm 0,017^a$	$2,836 \pm 0,064^c$	$4,076 \pm 0,048^d$	$2,073 \pm 0,055^b$
Số rễ mới hình thành	$10,224 \pm 0,479^c$	$7,847 \pm 0,050^b$	$5,170 \pm 0,132^a$	$15,058 \pm 0,091^d$
Chiều dài rễ mới (mm)	$130,841 \pm 0,529^c$	$99,868 \pm 0,598^b$	$28,271 \pm 3,241^a$	$140,234 \pm 0,196^d$
Đường kính rễ mới (mm)	$2,042 \pm 0,065^c$	$1,723 \pm 0,039^b$	$1,530 \pm 0,026^a$	$2,520 \pm 0,036^d$
Số giá hành mới	$1,776 \pm 0,034^b$	$1,078 \pm 0,106^a$	$1,040 \pm 0,108^a$	$2,031 \pm 0,044^b$
Đường kính giá hành mới (mm)	$18,236 \pm 0,257^d$	$11,238 \pm 0,213^b$	$8,443 \pm 0,112^a$	$16,909 \pm 0,482^c$
Chiều cao giá hành mới (mm)	$140,844 \pm 0,333^c$	$101,368 \pm 0,690^b$	$66,009 \pm 0,675^a$	$170,367 \pm 0,814^d$
Số lá ở giá hành mới	$6,571 \pm 0,139^d$	$5,517 \pm 0,168^c$	$3,612 \pm 0,123^a$	$4,868 \pm 0,052^b$
Chiều dài lá (mm)	$168,070 \pm 0,444^c$	$120,678 \pm 2,770^b$	$105,707 \pm 2,770^a$	$188,710 \pm 0,946^d$
Chiều rộng lá (mm)	$42,787 \pm 0,591^c$	$31,508 \pm 0,490^b$	$23,284 \pm 3,157^a$	$44,574 \pm 0,681^d$
Tỷ lệ cây con sống (%)	100	100	100	100

Các số trung bình trong các cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt ở mức $p < 0,05$



Hình 6. Cây sinh trưởng trên các giá thể khác nhau sau 6 tuần. Giá thể than củi đập nhỏ (a), giá thể dớn trắng (b), giá thể vỏ đậu phộng (c), giá thể vỏ dừa chẻ nhỏ (d).

Trên giá than củi đập nhỏ và vỏ đậu phộng cây sinh trưởng tốt nhất do than củi đập nhỏ và vỏ đậu phộng là các giá thể thoát nước tốt (Hình 6). Theo Dương Công Kiên (2006) nếu giữ khô ráo giữa các lần tưới trong giai đoạn tăng trưởng sẽ giúp cây cứng cáp hơn [2]. Phạm Thị Liên (2010) cũng cho rằng nếu trồng trên giá thể thoát nước tốt (than củi) thì số lần tưới không ảnh hưởng đến tỷ lệ chết còn trồng trên giá thể thoát nước kém thì số lần tưới ảnh hưởng đến tỷ lệ chết [3].

Từ các kết quả trên, chúng tôi nhận thấy vỏ đậu phộng là giá thể thích hợp nhất cho sự sinh trưởng của cây lan con *Dendrobium caesar*.

4. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu này, chúng tôi có một số kết luận như sau. Thời gian khử trùng bề mặt mẫu cây keiki tốt nhất với dung dịch sodium hypochlorite 2,5 % là 15 phút. Môi trường KC bổ sung BA 2,0 mg/L thích hợp nhất trong nhân nhanh chồi lan *Dendrobium caesar* không qua con đường tạo PLB và mô sẹo. Môi trường KC bổ sung 1,0 mg/L IAA và 0,5 g/L AC cho hiệu quả tốt nhất trong việc cảm ứng tạo rễ lan *Dendrobium caesar*. Vỏ dừa chẻ nhỏ là loại giá thể thích hợp nhất để chuyển cây lan con ra vườn ươm với tỷ lệ sống cao. Giá thể tốt nhất cho sự sinh trưởng của lan *Dendrobium caesar* là vỏ đậu phộng sau khi được xử lý loại bỏ mầm bệnh, nấm mốc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] P. Deepak, R. Kheta, Harish, N.S. Shekhawat, In vitro propagation of *Eulophianuda* Lindl., an endangered orchid, *Scientia Horticulturae*, 139, 46–52, 2012.
- [2] D.C. Kiên, Lan *Dendrobium*, Giáo trình Nuôi cấy mô tập III, Đại học Quốc gia TP.HCM, Tủ sách Trường Đại học Khoa Học Tự Nhiên, 9–44, 2006).
- [3] P.T. Liên, Nghiên cứu quy trình công nghệ phát triển một số giống phong lan Hoàng thảo (*Dendrobium*) tại miền Bắc Việt Nam phục vụ nhu cầu trong nước và xuất khẩu, Đề tài nghiên cứu phát triển và ứng dụng Công nghệ tiên tiến trong sản xuất các sản phẩm xuất khẩu chủ lực, Bộ Khoa Học và Công Nghệ, Bộ Nông Nghiệp và Phát triển Nông thôn, Hà Nội, 2011.
- [4] N.T. Pha, T.T. X. Mai, L.T. M. Trang, N.T. Liên, “Nuôi cấy mầm ngủ phát hoa lan Hồ Điệp (*Phalaenopsis* sp.)”, *Tạp chí Khoa học*, 20, 12–20, 2011.
- [5] D.T. Nhật, H.N. Trâm, N.P. Huy, Đ.V. Khiêm, “Ảnh hưởng của nước dừa và sucrose lên sự tăng sinh mô sẹo và hình thành phôi vô tính ở loài lan hồ điệp *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume”, *Tạp chí Sinh học*, 31, 1, 77–84, 2009.
- [6] B. Saurabh, Plant tissue culture, Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Bahadurgarh, Haryana, India, 31–107, 2015.
- [7] S. Madhu, P. Promila, In vitro propagation of *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae)-seed germination to flowering, *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22, 2, 157–167, 2012.
- [8] K.P. Martin, J. Geevarghese, D. Joseph, J. Madassery, In vitro propagation of *Dendrobium hybrids* using flower stalk node explants, *Indian Journal of Experimental Biology*, 280–285, 2006.
- [9] P. Deepak, R. Kheta, Harish, N.S. Shekhawat, In vitro propagation of *Eulophianuda* Lindl., an endangered

orchid, *Scientia Horticulturae*, 139, 46–52, 2012.

- [10] A.T. da S. Jaime, J. Xiaohua, D. Judit, L. Jiangjie, W. Huizhong, Z. Gerhard, C.C. Jean, Z. Songjun, Advances in *Dendrobium* molecular research: applications in genetic variation, identification and breeding, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, thiều trang, 2015.

- [11] N.Q. Thạch, P.T.C. Miện, “Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống loài lan Kim Tuyền (*Anoectochilus setaceus* Blume) *in vitro* bảo tồn nguồn dược liệu quý”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 10, 4, 597–903, 2012.

Micropropagation and nursery at garden of *Dendrobium caesar*

Pham Minh Quang, Duong Cong Kien, Quach Ngo Diem Phuong,
Hoang Thi Thanh Minh

University of Science, VNU-HCM
Corresponding author: httminh@hemus.edu.vn

Received: 07-01-2017, Accepted: 15-05-2017, Published: 12-09-2018

Abstract—*Dendrobium* is one of the largest and most important orchid genera because of their ornamental and commercial value. Plant tissue culture is an established method for the effective micropropagation of of valuable plants. In this study, *Dendrobium caesar* keikis were sterilized with sodium hypochlorite 2.5 % in 15 minutes. Effects of 3 kinds of cytokinin (TDZ, BA and kinetin), adenine and 3 kinds of auxin (IAA, IBA, NAA) with different concentrations on inducing shoots and roots were studied. The highest shoot initiation was observed on Knudson C (KC) medium supplemented with BA 2.0

mg/L. Strong roots were induced in KC media supplied with 0.5 g/L active charcoal (AC) and 1.0 mg/L IAA. In order to transfer *in vitro* plant to the nursery garden, the highest percentage of survival seedling was shown on coconut husk substrate, and peanut husk was the best for the growth and development of *Dendrobium caesar*. Micropropagation and nursery at garden for *Dendrobium caesar* were successfully established.

Index Terms—*Dendrobium caesar*, growth substrate, *in vitro*, micropropagation