

NHÂN GIỐNG *IN VITRO* LAN NGỌC ĐIỂM (*Rhynchostylis gigantea* L.) HÒN HÈO

Phan Diễm Quỳnh^{1*}, Nguyễn Trường Giang¹, Huỳnh Hữu Đức¹,

Hà Thị Loan¹, Lê Thị Thu Hằng¹, Nguyễn Kim Thủy¹

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

*Email: quynhdiem1471@gmail.com

TÓM TẮT

Ngọc Điểm Hòn Hèo là một trong những loài phong lan bản địa quý của Việt Nam. Việc áp dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật không chỉ góp phần lưu giữ nguồn gen quý mà còn giúp nhân nhanh tạo nguồn cây giống với số lượng lớn. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chồi đỉnh lan Ngọc Điểm Hòn Hèo được khử trùng với dung dịch Javel 50% trong 20 phút cho tỷ lệ mẫu sống vô trùng đạt 33,3%. Môi trường MS có bổ sung BA 1 mg/L và IBA 1 mg/L thích hợp cho việc cảm ứng tạo PLBs từ chồi với số lượng đạt 2,22 PLBs/mẫu sau 8 tuần nuôi cấy. Môi trường MS có bổ sung 30% nước dừa thích hợp cho quá trình nhân nhanh chồi. Môi trường VW thích hợp cho việc tạo cây hoàn chỉnh. Cây Ngọc Điểm Hòn Hèo cấy mô đạt tỷ lệ sống 94,7% sau 240 ngày trồng trên giá thể gồm 1 rêu rừng : 1 than củi và tưới 1 lần/ngày.

Từ khóa: *Rhynchostylis gigantea* L Hòn Hèo, *in vitro*, chồi đỉnh, nhân giống.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan Ngọc Điểm Hòn Hèo (*Rhynchostylis gigantea* L.) là một trong những loài phong lan bản địa quý của Việt Nam thuộc chi Ngọc Điểm (*Rhynchostylis*), phân bố từ Bình Thuận kéo dài đến thành phố Nha Trang ra tận những đảo xa, ngược lên sông Krông Pách (Đắk Lắk). Lan Ngọc Điểm Hòn Hèo thuộc dòng lan cao cấp, thường nở hoa vào mùa xuân trong dịp Tết cổ truyền của người Việt Nam. Cây có hệ tán lá khá dày và to mọc đan chéo nhau xòe ra theo hình cánh quạt khá đẹp. Hoa màu trắng tím, chùm hoa rủ xuống, lâu tàn, hương thơm quyến rũ, lan tỏa nên được người chơi lan sưu tầm và ưa chuộng nhất. Điều này đã tạo cơ hội cho nhiều đối tượng kinh doanh hoa lan khai thác và tàn phá quần thể tự nhiên của loài lan này. Thực tế, những khu rừng nguyên sinh thuộc các tỉnh Gia Lai, Kontum, Khánh Hòa, Bình Phước (cũ)... đã bị người dân xâm nhập và săn lùng đem về bán với giá dao động từ vài trăm ngàn đồng đến vài triệu đồng/kg. Vì vậy, hiện nay lan Ngọc Điểm Hòn Hèo không còn được buôn bán tràn lan trên thị trường và việc tìm mua những loài Ngọc Điểm Hòn Hèo trở nên khó khăn vì đã bị khai thác cạn kiệt.

Với nhận thức nguồn gen cây trồng là tài sản quốc gia cần phải được bảo tồn và khai thác để phục vụ phát triển kinh tế, xã hội, an ninh quốc phòng nên việc nhân giống *in vitro* sẽ góp phần bảo tồn nguồn gen, đồng thời duy trì nhân nuôi sau đó đưa trả về nơi nguyên sinh để tiếp tục bảo tồn tại chỗ đồng thời cung cấp nguồn cây giống bản địa quý và đáp ứng nhu cầu của người chơi lan trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh và cả nước.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Địa điểm và vật liệu nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Khu nuôi cấy mô thuộc Trung tâm Công nghệ sinh học thành phố Hồ Chí Minh.

Chồi *in vitro* lan Ngọc Điểm Hòn Hèo có 2 - 3 lá, kích thước đồng nhất.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy: Môi trường MS cơ bản (Murashige, Skoog, 1962) có bổ sung 30 g/l sucrose; 0,5 g/l peptone; 0,1 g/l inositol; 7 g/l agar; pH = 5,5. Điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ngày; cường độ chiếu sáng đối với thí nghiệm tạo PLBs và nhân chồi là $50 \pm 2 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$, đối với thí nghiệm tạo cây hoàn chỉnh là $25 \pm 2 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát điều kiện khử trùng mẫu tạo vật liệu in vitro vô trùng

Chồi đỉnh (cây con) của lan Ngọc Điểm Hòn Hèo được rửa sạch bằng nước sau đó lau bằng xà phòng loãng, lau bằng cồn 70°. Rửa bằng xà phòng loãng 20 phút, rửa sạch bằng nước, sau đó xử lý bằng dung dịch Javel (thương phẩm) có nhỏ 2 giọt Tweens - 20 với 3 nồng độ: i/1 Javel pha 3 nước; ii/1 Javel pha 2 nước; iii/1 Javel pha 1 nước trong thời gian 10 phút, 20 phút và 30 phút, cuối cùng rửa lại mẫu bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần. Mẫu chồi đỉnh sau khi xử lý cất bỏ phần bị tổn thương, cắt đoạn có kích thước 0,5 - 1 cm cấy vào môi trường MS bổ sung 30 g/l sucrose, 0,5 g/l peptone, 0,1 g/l inositol 7 g/l agar, môi trường được điều chỉnh ở pH = 5,5. Thí nghiệm gồm 9 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 5 chai. Theo dõi tỷ lệ mẫu vô trùng (%), tỷ lệ mẫu sống vô trùng (%), tỷ lệ mẫu chết (%), tỷ lệ mẫu nhiễm (nhiễm nấm, nhiễm khuẩn) (%) sau hai tuần.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình cảm ứng tạo PLBs, nhân nhanh PLBs

Chồi đỉnh có kích thước 0,5 - 1 mm, hủy đỉnh và tạo vết thương ở gốc được cấy lên môi trường MS cơ bản bổ sung 30 g/l sucrose; 0,5 g/l peptone; 0,1 g/l inositol; 7 g/l agar ; pH = 5,5. Thí nghiệm gồm 12 nghiệm thức kết hợp giữa BA (0,5-2 mg/l), NAA (0,5-1 mg/l) và IBA (0,5-1 mg/l), mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 3 chai, mỗi chai 5 mẫu. Theo dõi tỷ lệ mẫu tạo phôi soma và PLBs (%), số phôi soma/mẫu và PLBs/mẫu sau 7-8 tuần nuôi cấy.

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình tái sinh chồi nhân nhanh chồi

PLBs có kích thước 1 - 3 mm được cấy lên môi trường MS có bổ sung BA (0 - 1 mg/L) và NAA (0 - 0,2 mg/L) hoặc 0-30% nước dừa và BA (0-1 mg/L). Thí nghiệm gồm 7 nghiệm thức mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 3 chai, mỗi chai 5 mẫu. Theo dõi số chồi/mẫu, tỷ lệ mẫu tạo chồi (%), khối lượng tươi (g), khối lượng khô (g).

Đánh giá khả năng tăng trưởng, phát triển của mẫu cấy sau 6 - 8 tuần nuôi cấy.

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của thành phần môi trường lên quá trình tạo cây hoàn chỉnh

Chồi đơn *in vitro* được loại bỏ phần rễ và cấy lên môi trường có bổ sung sucrose 20 g/l; 0,5 g/l peptone; 0,1 g/l inositol; 7 g/l agar; pH = 5,5. Thí nghiệm gồm 6 nghiệm thức là các môi trường khác nhau: MS (*Murashige T. and Skoog F., 1962,*); MS1/2; MS1/4; Knudson C (*Morel, G.M., 1965*); VW (*Vacin E.F. and Went E.W., 1949*); B5 (*Gamborg O.L., 1968*), mỗi nghiệm thức 3 lần lặp, mỗi lần lặp 3 chai, mỗi chai 5 mẫu. Theo dõi số rễ/cây, chiều cao cây (cm), số lá/cây, chất lượng cây, khối lượng khô, hàm lượng Chlorophyll. Đánh giá khả năng tăng trưởng, phát triển của cây sau 6 - 8 tuần nuôi cấy.

2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình tạo cây hoàn chỉnh

Môi trường VW bổ sung sucrose 20 g/l; 0,5 g/l peptone; 0,1 g/l inositol; 7 g/l agar; pH = 5,5 được chọn làm môi trường nền để thực hiện các thí nghiệm tạo cây hoàn chỉnh. Thí nghiệm gồm 8 nghiệm thức kết hợp giữa (0-1) mg/l BA và (0,5-1) mg/l NAA, mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp 3 chai, mỗi chai 5 mẫu. Theo dõi số rễ /cây, chiều cao cây (cm), số lá/cây, chất lượng cây, khối lượng khô (g), hàm lượng Chlorophyll. Đánh giá khả năng tăng trưởng, phát triển của cây sau 6-8 tuần nuôi cấy.

2.2.6. Khảo sát ảnh hưởng của nước tưới và giá thể đến tỷ lệ sống của cây con ngoài vườn ươm

Sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường cảm ứng tạo rễ, cây con hoàn chỉnh được chuyển vào các giá thể khác nhau (chỉ xơ dừa, rêu rừng, vỏ thông, than củi vụn) để khảo sát khả năng thích nghi của cây trong điều kiện vườn ươm. Thí nghiệm 02 yếu tố gồm: Yếu tố A- Giá thể trồng (A1: 100% chỉ xơ dừa (ĐC), A2: 100% Rêu rừng, A3: 1 Rêu rừng : 1 than củi vụn, A4: 1 Rêu rừng : 1 vỏ thông; yếu tố B- Số lần tưới nước (B1: Tưới nước 1 lần/ngày, B2: Tưới nước 2 lần/ngày (ĐC), B3: Tưới nước cách 1 ngày, 2 lần/ngày). Thí nghiệm bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại, 50 cây/nghiệm thức/lần lặp, diện tích khoảng 0,22

m²/thí nghiệm thức/lần lặp. Theo dõi tỷ lệ cây sống (%), số rễ/cây, chiều cao cây (cm), số lá/cây

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu thu thập và được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và Minitab 17.0, SAS 9.1, trắc nghiệm phân hạng Duncan's test hoặc LSD.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

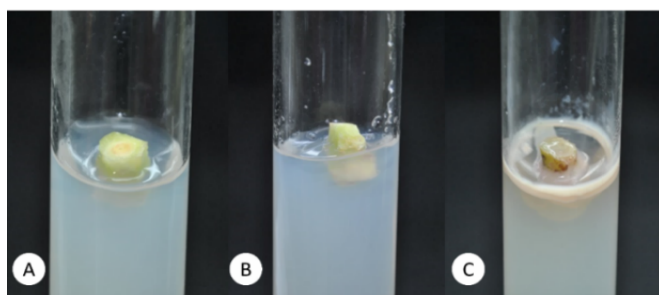
3.1. Khảo sát điều kiện khử trùng mẫu tạo vật liệu *in vitro* vô trùng

Kết quả khử trùng chồi đỉnh với dung dịch Javel trong vòng 10 phút thì mẫu bị nhiễm ở tất cả

các nồng độ. Tỷ lệ sống tăng và tỷ lệ nhiễm giảm khi kéo dài thời gian khử trùng lên 20 phút và tăng nồng độ Javel lên mức cao nhất 50%. Tuy nhiên, khi thời gian khử trùng kéo dài đến 30 phút và xử lý với Javel nồng độ thấp 25% (NT7) làm cho mẫu bị nhiễm hoàn toàn. Ngoài ra, khi tăng nồng độ javel lần lượt 33,3% và 50% (NT8 và NT9) đã giảm được tỷ lệ nhiễm nhưng tỷ lệ chết tăng dần, tỷ lệ sống có tăng nhẹ ở NT8 nhưng sau đó không có dấu hiệu sống ở NT9. Sau 14 ngày, các mẫu còn sống vẫn được giữ nguyên, lớp mô màu xanh bên ngoài của chồi ngả vàng (Bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ Javel và thời gian khử trùng đến hiệu quả khử trùng mẫu chồi lan Ngọc Điểm Hòn Hèo

Nghiệm thức	Tỷ lệ (Javel : nước)	Thời gian (Phút)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)
1	1 : 4 (20%)	10	0	0	100
2	1 : 2 (33,3%)		0	0	100
3	1 : 1 (50%)		0	0	100
4	1 : 3 (25%)	20	0	0	100
5	1 : 2 (33,3%)		0	0	100
6	1 : 1 (50%)		33,33	16,67	50
7	1 : 3 (25%)	30	0	0	100
8	1 : 2 (33,3%)		16,67	16,67	66,67
9	1 : 1 (50%)		0	50	50



Hình 1. Mẫu chồi lan Ngọc Điểm Hòn Hèo sau khi được khử trùng. (A) Mẫu chồi mới được khử trùng, (B) Mẫu chồi sống vô trùng, (C) Mẫu chồi bị nhiễm khuẩn

3.2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình cảm ứng tạo PLBs

Nồng độ chất điều hòa sinh trưởng, tỷ lệ auxin và cytokinin ảnh hưởng đến quá trình cảm ứng tạo PLBs. Trong đó, NAA là một loại auxin có tác dụng kích thích sự phân bào và sinh trưởng của mô sẹo hay PLBs. BA là một loại cytokinin được dùng phổ biến trong việc kích thích phân hóa chồi

ở nhiều loài thực vật (Schaller et al., 2015) [1]. Trong nghiên cứu này, BA và NAA được kết hợp sử dụng ở các nồng độ khác nhau để khảo sát khả năng cảm ứng tạo PLBs từ chồi lan Ngọc điểm.

Kết quả từ bảng 2 cho thấy, các thí nghiệm có sự kết hợp giữa BA và IBA đều kích thích mẫu cảm ứng tạo PLBs trên 64,44%, nồng độ BA càng cao thì tỷ lệ cảm ứng càng tăng. Cảm ứng tạo PLBs từ chồi của lan Ngọc Điểm tốt nhất khi kết hợp giữa 1 mg/L BA và 1 mg/L IBA với PLBs đạt 2,22 PLBs/mẫu. Ngược lại, các thí nghiệm có bổ sung NAA cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo PLBs và chồi thấp (dưới 53,33%). Điều này cho thấy có sự khác biệt với một số nghiên cứu cảm ứng tạo PLBs trên một số giống lan khác trước đây. Theo Baker và cs (2014) [2], kết hợp 0,5 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA thích hợp cho sự tái sinh PLBs với 20,4 PLBs/mẫu trên loài hoa phong lan thuộc Catasetum. Tương tự kết quả nghiên cứu của H'Yon và cs (2020) [3] trên loài Dendrobium trankimianum cho thấy kết

hợp 2 mg/L BA và 0,5 mg/L NAA cho tỉ lệ tạo chất di truyền của từng loài quyết định sự khác PLBs đạt 90,11% với 10,24 PLBs. Chứng tỏ, bản biệt trong quá trình tái sinh PLBs.

Bảng 2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình cảm ứng tạo PLBs

Nghiệm thức	BA (mg/l)	NAA (mg/l)	IBA (mg/l)	Tỉ lệ tạo PLBs (%)	PLBs trung bình (PLBs/mẫu)	Chồi trung bình (chồi/mẫu)
NT 0	0	0	0	0	0 ^e	0 ^f
NT 1	0,5	0,5	0	46,67	1 ^{cd}	1,11 ^{de}
NT 2	0,5	1	0	44,44	1 ^{cd}	0,89 ^{de}
NT 3	0,5	0	0,5	64,44	1,11 ^{cd}	1,33 ^{cd}
NT 4	0,5	0	1	66,67	0 ^e	1,89 ^b
NT 5	1	0,5	0	42,22	0 ^e	1,22 ^{cde}
NT 6	1	1	0	51,11	1,22 ^c	1,33 ^{cd}
NT 7	1	0	0,5	64,44	1,11 ^{cd}	1,67 ^{bc}
NT 8	1	0	1	73,33	2,22 ^a	2,89 ^a
NT 9	2	0,5	0	53,33	0,89 ^d	1,11 ^{de}
NT 10	2	1	0	42,22	1,67 ^b	0,78 ^e
NT 11	2	0	0,5	95,56	1,78 ^b	3,33 ^a
NT 12	2	0	1	73,33	1,89 ^b	3,11 ^a
CV%					29,34	29,22
BA + NAA + IBA					***	***

*Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột (PLBs trung bình, chồi trung bình) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê; ***: Khác biệt về mặt thống kê ở mức $P < 0,001$.*

Sau 3 tuần nuôi cấy, các mẫu chưa có thay đổi nhiều về mặt hình thái. Từ tuần thứ 4, đa số các mẫu có sự thay đổi về hình thái như phình to ở gốc và một số mẫu hình thành rễ ở nghiệm thức đối chứng (NT 0). Từ tuần thứ 5, ở vị trí tăng sinh ở phần gốc của các mẫu có hiện tượng cảm ứng tạo PLBs, một số mẫu bắt đầu hình thành chồi ở gốc, một số mẫu có phần gốc hóa nâu, có sự tăng trưởng về chiều dài lá của lá đã cắt. Ở tuần thứ 8,

các mẫu trong nghiệm thức đối chứng (NT 0) hình thành và phát triển rễ, tạo cây hoàn chỉnh, cây xanh. Mẫu ở các nghiệm thức còn lại hình thành PLBs và chồi ở phần gốc và vị trí tạo vết thương đồng thời mẫu ban đầu vẫn tiếp tục phát triển. Một số mẫu đã hình thành PLBs và chồi bắt đầu hóa nâu ở phần gốc hoặc mẫu chết nhưng chồi mới và PLBs hình thành vẫn phát triển nhưng chậm.



Hình 2. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng (BA, IBA, NAA) lên quá trình cảm ứng tạo PLBs với các nồng độ khác nhau khác nhau sau 8 tuần nuôi cấy. 0: BA 0 mg/l, NAA 0 mg/l, IBA 0 mg/l; 1: BA 0,5 mg/l, NAA 0,5 mg/l, IBA 0 mg/l; 2: BA 0,5 mg/l, NAA 1 mg/l, IBA 0 mg/l; 3: BA 0,5 mg/l, NAA 0 mg/l, IBA 0,5 mg/l; 4: BA 0,5 mg/l, NAA 0 mg/l, IBA 1 mg/l; 5: BA 1 mg/l, NAA 0,5 mg/l, IBA 0 mg/l; 6: BA 1 mg/l, NAA 1 mg/l, IBA 0 mg/l; 7: BA 1 mg/l, NAA 0 mg/l, IBA 0,5 mg/l; 8: BA 1 mg/l, NAA 0 mg/l, IBA 1 mg/l; 9: BA 2 mg/l, NAA 0,5 mg/l, IBA 0 mg/l; 10: BA 2 mg/l, NAA 1 mg/l, IBA 0 mg/l; 11: BA 2 mg/l, NAA 0 mg/l, IBA 0,5 mg/l; 12: BA 2 mg/l, NAA 0 mg/l, IBA 1 mg/l

3.3. Ảnh hưởng của nước dừa lên quá trình tái sinh chồi và nhân nhanh chồi

BA là chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin, có tác dụng tăng cường sự phân bào, giúp các tế bào thực vật tăng sinh nhanh hơn, tạo điều kiện thuận lợi cho việc tái sinh chồi. Nước dừa đã được chứng minh có khả năng kích thích phân hóa và nhân nhanh chồi ở nhiều loài cây. Kết quả nghiên cứu của Yong và cs (2009) [4] cho thấy nước dừa chứa 94% là nước và là chất thúc đẩy tăng trưởng của chồi. Sau 8 tuần quan sát và thu nhận số liệu cho

thấy, nước dừa khi kết hợp với BA có vai trò tác động đến sự tái sinh chồi của các mẫu PLBs, cụ thể mẫu ở các nghiệm thức đều có cảm ứng tạo chồi.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, ảnh hưởng của các nồng độ BA kết hợp với nồng độ nước dừa khác nhau lên số lượng chồi được tái sinh không có sự khác biệt về mặt thống kê, đặc biệt việc bổ sung 10% nước dừa và 0,5 mg/l BA thích hợp cho việc hình thành chồi từ PLBs với số chồi, tỷ lệ mẫu tạo chồi, khối lượng tươi và khô tương ứng là 2,07 chồi/mẫu, 56%, 0,317 g và 0,031 g.

Bảng 3. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng BA và nước dừa lên quá trình tái sinh chồi và nhân nhanh chồi

NT	Nước dừa (%)	BA (mg/l)	Chồi (chồi/mẫu)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)
NT 0	0	0	1,76 ^a	49	44	0,323	0,024
NT 1	10	0,5	2,07 ^a	56	13	0,317	0,031
NT 2	10	1	2,0 ^a	67	16	0,283	0,022
NT 3	20	0,5	1,27 ^b	53	22	0,184	0,017
NT 4	20	1	1,8 ^a	58	18	0,238	0,025
NT 5	30	0,5	1,71 ^a	62	16	0,173	0,024
NT 6	30	1	1,13 ^b	67	20	0,134	0,015
CV%			26,67				
Nước dừa + BA			***				

*Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột (chồi) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê; ***: Khác biệt về mặt thống kê ở mức $P < 0,001$.*

Mẫu chồi phát triển ở nghiệm thức này xanh tốt, lá không bung to, tỷ lệ mẫu chết thấp (13%). Ngược lại, ở nghiệm thức bổ sung nước dừa 30% và 1 mg/l BA cho khả năng nhân chồi cao nhưng tỷ lệ tạo chồi

trung bình trên mẫu thấp. Nghiệm thức 3 có số lượng chồi trung bình thấp nhất với 1,27 chồi/mẫu. Các nghiệm còn lại có số chồi trung bình tốt tương đương với đối chứng (NT 0) về mặt thống kê.



Hình 3. Các cụm PLBs sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS kết hợp với các nồng độ nước dừa và BA khác nhau. A/ 0% nước dừa + 0 mg/L BA, B/ 10% nước dừa + 0,5 mg/L BA, C/ 10% nước dừa + 1 mg/L BA, D/ 20% nước dừa + 0,5 mg/L BA, E/ 20% nước dừa + 1 mg/L BA, F/ 30% nước dừa + 0,5 mg/L BA, G/ 30% nước dừa + 1 mg/L BA

3.4. Khảo sát ảnh hưởng của thành phần môi trường lên quá trình tạo cây hoàn chỉnh

Một số nghiên cứu cho thấy, ngoài việc ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình tạo cây hoàn chỉnh thì thành phần/hàm lượng khoáng đa lượng cũng ảnh hưởng đến quá trình tạo cây *in vitro* trên một số đối tượng cây trồng. Nghiên cứu này cho thấy, các loại môi trường khác nhau có hàm lượng khoáng đa lượng khác nhau cũng đã ảnh hưởng đến quá trình tạo cây hoàn chỉnh lan Ngọc Điểm.

Sau 8 tuần nuôi cấy, tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ trên các môi trường khác nhau lần lượt là VW (100%), MS (93%), MS 1/2 (91%), MS 1/4 (89%), B5 (80%). Ở nghiệm thức sử dụng môi trường KC cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo rễ chỉ đạt 44%, rễ và cây

phát triển chậm. Nghiệm thức sử dụng môi trường VW cho kết quả tốt nhất với tỷ lệ mẫu tạo rễ, số lá mới hình thành, số rễ và chiều cao cây tương ứng 100%; 4 lá/cây; 3,04 rễ/cây; 1,51 cm/cây; rễ phát triển tốt, cây tăng trưởng nhanh, đường kính rễ lớn, lá màu xanh sáng; hàm lượng chlorophyll tổng đạt 588,7 µg/g. Nghiệm thức sử dụng môi trường MS cho thấy, sau 7 tuần nuôi cấy một số mẫu chuyển vàng, một số mẫu chết ở phần ngọn. Đối với nghiệm thức sử dụng môi trường MS 1/2 mẫu cảm ứng tạo rễ kém nhất với rễ ngắn, đường kính rễ nhỏ, lá xanh nhạt, cây phát triển chậm. Ở hai loại môi trường KC và B5 không thích hợp cho sự sinh trưởng của cây thể hiện qua sự tăng trưởng chậm về chiều cao, rễ kém phát triển, một số lá ngả vàng và mẫu chết dần.

Bảng 4. Ảnh hưởng của thành phần/hàm lượng khoáng đa lượng lên quá trình tạo cây hoàn chỉnh lan Ngọc Điểm Hòn Hèo

Nghiệm thức	Số lá trung bình	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)	Số rễ trung bình	Chiều cao trung bình (cm)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Hàm lượng chlorophyll tổng (µg/g)	Tỷ lệ chlorophyll a/b
MS	3,11 ^b	93	1,89 ^b	1,09 ^b	0,656	0,041	663	2,15
MS 1/2	3,47 ^b	91	1,82 ^b	1,02 ^{bc}	0,366	0,029	482,1	2,97
MS 1/4	4,16 ^a	89	2,13 ^b	1,13 ^b	0,433	0,031	524,2	2,44
KC	3,44 ^b	44	0,6 ^d	0,82 ^{cd}	0,335	0,022	511,4	2,2
VW	4,0 ^a	100	3,04 ^a	1,51 ^a	0,544	0,045	588,7	2,45
B5	3,38 ^b	80	1,16 ^c	0,68 ^d	0,350	0,031	380,7	2,42
CV%	13,58	93	22,79	21,55				
Môi trường	***		***	***				

*Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ***: Khác biệt về mặt thống kê ở mức $P < 0,001$.*

Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường VW và MS 1/4 thích hợp cho quá trình tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh cho lan Ngọc điểm. Tuy nhiên, khi nuôi cấy trên môi trường VW cây sinh trưởng và phát triển tốt hơn so với môi trường MS 1/4. Đặc biệt, hàm lượng khoáng đa lượng ở hai môi trường này thấp hơn so với các môi trường khác đã sử dụng trong nghiên cứu. Chứng tỏ, thành phần/hàm lượng khoáng đa lượng đã ảnh hưởng đến việc tạo cây *in vitro* lan Ngọc điểm. Hàm

lượng nitơ cao ảnh hưởng đến sự phát triển của rễ, lá bị vàng sau thời gian nuôi cấy. Theo kết quả nghiên cứu của Dương Công Kiên (2003) [5], việc sử dụng khoáng ở giai đoạn tạo cây cần nồng độ thấp sẽ thích hợp cho một số giống cây. Nghiên cứu của Kaewkhiew và cs (2010) [6], cho thấy môi trường VW thích hợp cho việc tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh trên lan Ngọc điểm với số lá là 4,07 lá/cây; số rễ là 3,9 rễ/cây; khối lượng tươi 1,73 g. Từ kết quả trên cho thấy, môi trường VW thích hợp nhất

để tạo cây hoàn chỉnh *in vitro* trên lan Ngọc Điểm Hòn Hèo.



Hình 4. Mẫu cây lan Ngọc Điểm *in vitro* trên các môi trường khác nhau sau 8 tuần. A/ Môi trường MS, B/ Môi trường MS 1/2, C/ Môi trường MS 1/4, D/ Môi trường Knudson C, E/ Môi trường VW, F/ Môi trường B5

3.5. Ảnh hưởng của giá thể và chế độ nước tưới đến tỷ lệ sống của cây con ngoài vườn ươm

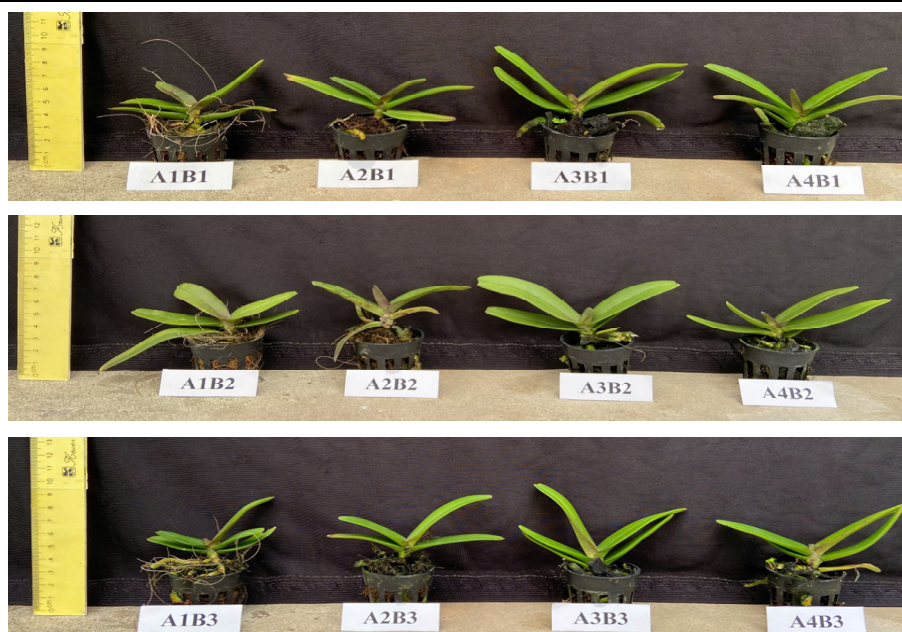
Bảng 5. Ảnh hưởng của giá thể và chế độ nước tưới đến các chỉ tiêu sinh trưởng của lan Ngọc Điểm giai đoạn hậu cấy mô sau 240 ngày trồng

Chỉ tiêu	Giá thể	1 lần/ngày	2 lần/ngày	Tưới cách ngày, 2 lần/ngày	Trung bình
Tỷ lệ sống (%)	100% chỉ xơ dừa	68,0 ^{fg}	70,7 ^f	64,7 ^g	67,8 ^c
	100% rêu rừng	68,0 ^{fg}	56,0 ^h	78,0 ^e	67,3 ^c
	Rêu rừng + than củi vụn (1 : 1)	94,7 ^a	93,3 ^{ab}	90,7 ^{bc}	92,9 ^a
	Rêu rừng + vỏ thông (1 : 1)	88,0 ^{cd}	86,0 ^d	87,3 ^{cd}	87,1 ^b
	Trung bình (B)	79,7 ^a	76,5 ^b	80,2 ^a	
	$CV(\%) = 2,32 F_A = 395,60^{**} F_B = 8,50^{**} F_{AB} = 22,60^{**}$				
Số rễ/cây	100% chỉ xơ dừa	5,4	5,2	5,2	5,3 ^b
	100% rêu rừng	5,5	5,0	5,5	5,3 ^b
	Rêu rừng + than củi vụn (1 : 1)	7,0	6,8	5,7	6,5 ^a
	Rêu rừng + vỏ thông (1 : 1)	6,6	6,5	5,6	6,2 ^a
	Trung bình (B)	6,1 ^a	5,9 ^{ab}	5,5 ^b	
	$CV(\%) = 9,02 F_A = 13,03^{**} F_B = 3,94^{*} F_{AB} = 1,80^{ns}$				
Chiều cao cây (cm)	100% chỉ xơ dừa	5,9 ^{efg}	6,2 ^{defg}	5,7 ^{fg}	5,9 ^c
	100% rêu rừng	6,3 ^{defg}	5,6 ^g	6,3 ^{cdef}	6,1 ^c
	Rêu rừng + than củi vụn (1 : 1)	7,8 ^a	7,2 ^b	6,6 ^{bcd}	7,2 ^a

Cây lan Ngọc Điểm hoàn chỉnh nuôi cấy trong phòng thí nghiệm cần được thuần hóa ở giai đoạn vườn ươm để cây có thể sinh trưởng, phát triển tốt ở điều kiện bên ngoài. Giá thể và chế độ nước tưới là hai yếu tố quan trọng liên quan đến tỷ lệ sống của cây lan Ngọc Điểm cấy mô. Mỗi loại giá thể đều có ưu và nhược điểm, cần sử dụng, phối trộn phù hợp. Nếu sử dụng giá thể không phù hợp, tưới nước quá ẩm hoặc quá khô dễ làm cây sinh trưởng kém hoặc bị chết. Cây lan Ngọc Điểm có khả năng chịu úng kém, vì vậy cây con hậu cấy mô cần được ươm trong chậu có nhiều lỗ thoát nước xung quanh và phần đáy chậu không bị bít lại.

Giai đoạn 240 ngày sau trồng, khi trồng trên giá thể rêu rừng + than củi vụn (tỷ lệ 1 : 1) và tưới nước 1 - 2 lần/ngày, cây sinh trưởng khỏe, chiều cao cây đạt từ 7,2 - 7,8cm, vượt trội so với các nghiệm thức còn lại từ 1,6 - 1,9 cm. Đặc biệt nghiệm thức rêu rừng + than củi vụn (tỷ lệ 1 : 1) kết hợp tưới nước 1 lần/ngày giúp kích thích cây ra lá tốt nhất đạt 6,0 lá/cây (Bảng 5).

Chỉ tiêu	Giá thể	1 lần/ngày	2 lần/ngày	Tưới cách ngày, 2 lần/ngày	Trung bình
	Rêu rừng + vỏ thông (1 : 1)	6,9 ^{bc}	6,7 ^{bcd}	6,4 ^{cde}	6,7 ^b
	Trung bình (B)	6,7 ^a	6,4 ^{ab}	6,2 ^b	
	$CV(\%) = 5,31 F_A = 27,47^{**} F_B = 6,21^{**} F_{AB} = 3,53^*$				
Số lá/cây	100% chỉ xơ dừa	4,9	4,8	4,7	4,8 ^c
	100% rêu rừng	4,6	4,7	4,7	4,7 ^c
	Rêu rừng + than củi vụn (1 : 1)	6,0	5,7	5,4	5,7 ^a
	Rêu rừng + vỏ thông (1 : 1)	5,4	5,3	5,3	5,3 ^b
	Trung bình (B)	5,2 ^a	5,1 ^{ab}	5,0 ^b	
	$CV(\%) = 3,32 F_A = 68,22^{**} F_B = 4,24^* F_{AB} = 1,61^{ns}$				



Hình 5. Cây lan Ngọc Điểm hậu cấy mô trồng trên các loại giá thể và chế độ tưới khác nhau tại thời điểm 240 ngày sau trồng (yếu tố A: A1: 100% chỉ xơ dừa, A2: 100% rêu rừng, A3: Rêu rừng + than củi vụn (1 : 1), A4: Rêu rừng + vỏ thông (1 : 1); yếu tố B: B1: Tưới 1 lần/ngày, B2: Tưới 2 lần/ngày, B3: Tưới cách ngày, 2 lần/ngày)

4. KẾT LUẬN

Chất điều hòa sinh trưởng cytokinin và auxin đã ảnh hưởng lên quá trình cảm ứng tạo PLBs trên lan Ngọc Điểm. Nghiên cứu đã xác định được nồng độ và tỷ lệ chất điều hòa sinh trưởng thích hợp cho việc cảm ứng tạo PLBs từ chồi lan Ngọc Điểm là BA 1 mg/L, IBA 1 mg/L, nước dừa 10%. Hàm lượng nước dừa 30% và BA 0,5 mg/L thích hợp cho quá trình tái sinh chồi từ PLBs. Môi trường VW thích hợp cho việc tái sinh cây hoàn chỉnh với số rễ trung bình là 3,04 rễ/cây. Cây con

phát triển tốt khi trồng trên giá thể phối trộn theo tỷ lệ 1 rêu rừng : 1 than củi và tưới 1 lần/ngày.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Trung tâm Công nghệ sinh học thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ trang thiết bị và cơ sở vật chất để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Schaller GE, Bishopp A & Kieber JJ (2015). The yin-yang of hormones: Cytokinin and auxin

interactions in plant development. *Plant Cell*, 27: 44 - 63.

2. Baker A., Kaviani B., Nematzadeh G. & Negahdar N., (2014). Micropropagation of *Orchis catasetum*-a rare and endangered orchid. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 13: 197 - 205.

3. H'Yon Nie Bing, Dang Thi Tham, Tran Thai Vinh, Quach Van Hoi, Vu Kim Cong & Nong Van Duy (2018). *In vitro* propagation of the new orchid *Dendrobium Trankimianum* Yukawa, *Journal of Biotechnology*, 16 (4): 649 - 657

4. Yong JW, Ge L, Ng YF & Tan SN (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, 14: 5144 - 5164.

5. Dương Công Kiên (2003). Nuôi cấy mô thực vật II, Đại học quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, tr 205 - 210.

6. Kaewkhiew P, Kaewduangta W.(2010). Natural additives modification medium: Growth of *Rhynchosytilis gigantea* by tissue culture technique. *Asian Journal of Plant Sciences*, 9: 498 - 501.

***IN VITRO* PROPAGATION OF *Rhynchosytilis giagantea* L. HON HEO**

Phan Diem Quynh¹, Nguyen Truong Giang¹, Huynh Huu Duc¹,

Ha Thi Loan¹, Le Thi Thu Hang¹, Nguyen Kim Thuy¹

¹*Biotechnology Center of Ho Chi Minh City*

Abstract

Ngoc Diem Hon Heo is one of the precious native orchid species of VietNam. The application of plant tissue culture techniques not only contributes to preserving precious genetic resources but also helps to quickly multiply and create a large number of seedlings. The results showed that Ngoc Diem Hon Heo shoots were sterilized in Javel 50% for 20 minutes for a rate of sterile living samples reach 33.3%. The MS medium supplemented with 1 mg/L BA and 1 mg/L IBA is suitable for inducing PLBs from shoots with 2.22 PLBs after 8 week. The most appropriate medium for fast *in vitro* propagation of shoots was MS + 30% coconut water. The VW medium used for growing of complete plants. Tissue-cultured Ngoc Diem Hon Heo plants achieved a high survival rate of 94.7% on a substrate of 1 forest moss: 1 charcoal and watered once a day after 240 days.

Keywords: *Rhynchosytilis giagantea* L. *Hon Heo*, *in vitro*, shoot tips, propagation.

Ngày nhận bài: 5/6/2025

Ngày chuyển phản biện: 02/7/2025

Ngày thông qua phản biện: 22/7/2025

Ngày duyệt đăng: 01/01/2026