

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG LAN KIẾM BA BỂ (*Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.) BẰNG KỸ THUẬT *IN VITRO*

Nguyễn Đắc Bình Minh¹, Nguyễn Đức Huy², Nguyễn Tiến Dũng³,
Chu Huy Tường^{1*}, Phan Thị Khánh Linh¹, Đào Thùy Dương¹

¹ Viện Nghiên cứu và Phát triển Vùng

² Học viên cao học, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

³ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

* Email: chuhuytuong@gmail.com

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cây lan kiếm Ba Bể (*Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.) góp phần bảo tồn loài lan này, làm cơ sở cho các nghiên cứu liên quan cũng như cung cấp nguồn giống lan cho thị trường. Quả lan được rửa sạch, khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 20 phút, cho tỉ lệ mẫu sống không nhiễm là 66,67%. Môi trường nền thích hợp cho nhân giống là môi trường MS + đường 30 g/l + agar 5,5 g/l; pH = 5,6 - 5,8; cho hệ số nhân chồi đạt 1,69. Để nâng cao hiệu quả nhân nhanh mẫu, bổ sung thêm vào môi trường nền: Nước dừa (100 ml/l) cho hệ số nhân chồi đạt 3,37; BAP (1 mg/l) cho hệ số nhân chồi đạt 3,76; kinentin (1,5 mg/l) cho hệ số nhân chồi đạt 3,52. Giai đoạn ra rễ, mẫu nuôi cấy trên môi trường nền bổ sung NAA 1,5 mg/l cho hệ số nhân rễ đạt 3,72. Khi bổ sung thêm than hoạt tính (THT) 1 g/l, mẫu nuôi cấy trên môi trường nền + NAA 1,5 mg/l + THT 1 g/l, cho hệ số nhân rễ tối ưu đạt 4,4. Giá thể tốt nhất cho cây con *in vitro* là giá thể bao gồm gỗ và đá bọt pumice (1: 1), với tỉ lệ cây sống sót là 93,33%.

Từ khóa: *In vitro*, lan kiếm Ba Bể, *Cymbidium aloifolium*, vi nhân giống.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi lan kiếm (*Cymbidium*), còn gọi là Đoàn kiếm, Thanh ngọc là một loài địa lan, thuộc họ phụ Orchidoideae. Các loài trong chi lan kiếm phân bố khắp các vùng khí hậu nhiệt đới, cận nhiệt đới, thường mọc trên các thân cây lớn trong rừng, vách đá ẩm ướt. Cây lan kiếm Ba Bể (*Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.) ở Việt Nam rất được ưa chuộng do cây có hoa rất đẹp, thời gian hoa nở dài. Ngoài làm cảnh, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. còn có nhiều tiềm năng khai thác trong ngành y dược, mỹ phẩm với nhiều tác dụng khác nhau như: Chống viêm, chống lão hóa, lợi tiểu, bảo vệ hệ thần kinh [1]. Trước tình hình lan kiếm cạn kiệt ngoài thiên nhiên, nhiều chương trình quốc gia về bảo tồn loài hoa quý này đã được triển khai, chủ yếu là thu thập, phân loại, nghiên cứu về các loài lan kiếm và bảo tồn môi trường sống tự nhiên của chúng.

Nhân giống *in vitro* có hệ số nhân giống cao, đồng nhất và ổn định về di truyền, có tiềm năng công nghiệp hóa. Các nghiên cứu nhằm thiết lập quy trình nhân nhanh *in vitro* loài *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. của Paul và cs (2019) [2], Kumar và cs (2022) [3] đã cho thấy, nhân giống *in vitro* cây lan kiếm với vật liệu ban đầu là hạt lan là hoàn toàn khả thi; trong đó, việc bổ sung BAP ở nồng độ thích hợp vào môi trường nền đóng vai trò quan trọng đến khả năng nhân nhanh mẫu; đặc biệt, phân tích chất chuyển hóa thứ cấp sơ bộ cho thấy, tiềm năng chống oxy hóa tốt hơn của cây tái sinh trong ống nghiệm so với cây mẹ. Ở Việt Nam, các nghiên cứu về nhân giống *in vitro* cũng đã được tiến hành với các loài thuộc chi lan kiếm như lan kiếm Phan Trí (*Cymbidium finlaysonianum* Lindl.) [4], lan kiếm Thanh Ngọc (*Cymbidium sinense* var *alba*) [5]. Dựa trên cơ sở của các nghiên cứu đã thành công ở trong và ngoài nước,

có thể thấy việc nghiên cứu nhân giống lan kiếm Ba Bể (*Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.) bằng phương pháp *in vitro* là cần thiết nhằm bảo tồn nguồn gen quý, phát triển nguồn cây giống sạch bệnh, đồng thời nhân giống trên quy mô lớn, đáp ứng nhu cầu làm cảnh và làm thuốc, phục vụ phát triển kinh tế và là cơ sở cho các nghiên cứu sâu hơn về loài lan này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Cây lan kiếm Ba Bể được thu thập tại khu vực huyện Ba Bể, tỉnh Bắc Kạn.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm 1: Khử trùng mẫu cấy

Mẫu quả lan được rửa bằng xà phòng sau đó rửa lại nhiều lần bằng nước sao cho sạch xà phòng. Khử trùng bề mặt quả bằng cách nhúng ngập vào dung dịch $HgCl_2$ 0,1% trong các khoảng thời gian: 5 phút, 10 phút, 15 phút, 20 phút, 25 phút; sau đó tráng lại bằng nước cất vô trùng 5 lần. Quả lan đã khử trùng được cắt theo chiều dọc và thu lấy hạt. Nuôi cấy hạt lan thu được trên môi trường MS để hạt nảy mầm. Thí nghiệm bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 10 mẫu. Thời gian theo dõi 2 tuần.

Thí nghiệm 2: Lựa chọn môi trường nền

Các mẫu sau khi được khử trùng, không nhiễm, có kích thước tương đương được cấy chuyển sang môi trường MS có nồng độ khác nhau: MS, 1/2 MS, 1/3 MS, 1/4 MS. Thí nghiệm bố trí ngẫu nhiên với 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 30 mẫu. Theo dõi mẫu trong 4 tuần. Môi trường thích hợp nhất sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng nhân nhanh mẫu

Các mẫu được cấy trên môi trường nền thích hợp có bổ sung thêm nước dừa với các nồng độ khác nhau: 0 ml/l; 10 ml/l; 20 ml/l; 30 ml/l; 50 ml/l; 100 ml/l. Thí nghiệm bố trí ngẫu nhiên với 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 30 mẫu. Thời gian theo dõi 4 tuần.

Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng nhân nhanh mẫu

Các mẫu được cấy trên môi trường nền thích hợp có bổ sung thêm BAP ở các nồng độ: 0 mg/l, 0,5 mg/l; 1 mg/l; 1,5 mg/l; 2 mg/l. Thí nghiệm bố trí ngẫu nhiên với 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 30 mẫu. Thời gian theo dõi 4 tuần.

Thí nghiệm 5: Ảnh hưởng của nồng độ kinetin đến khả năng nhân nhanh mẫu

Các mẫu được cấy trên môi trường nền thích hợp có bổ sung thêm kinetin với các nồng độ: 0 mg/l, 0,5 mg/l; 1 mg/l; 1,5 mg/l; 2 mg/l. Thí nghiệm bố trí ngẫu nhiên với 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 30 mẫu. Thời gian theo dõi 4 tuần.

Thí nghiệm 6: Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến khả năng ra rễ

Các mẫu chồi từ môi trường nhân nhanh được cấy sang môi trường nền thích hợp có bổ sung thêm NAA với các nồng độ: 0 mg/l, 0,5 mg/l; 1 mg/l; 1,5 mg/l; 2 mg/l. Thí nghiệm bố trí ngẫu nhiên với 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 30 mẫu. Thời gian theo dõi 4 tuần.

Thí nghiệm 7: Ảnh hưởng của than hoạt tính kết hợp với NAA đến khả năng ra rễ

Các mẫu chồi được nuôi cấy trên môi trường nền thích hợp có bổ sung thêm NAA với nồng độ NAA thích hợp nhất cho ra rễ đã xác định ở thí nghiệm trước và hàm lượng than hoạt tính khác nhau (0 g/l, 0,5 g/l; 1 g/l; 1,5 g/l; 2 g/l) để theo dõi khả năng ra rễ của mẫu. Thí nghiệm bố trí ngẫu nhiên với 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 30 mẫu. Thời gian theo dõi 4 tuần.

Thí nghiệm 8: Ảnh hưởng của giá thể ra cây đến tỉ lệ sống sót của cây

Cây *in vitro* hoàn chỉnh được đưa ra vườn ươm với các loại giá thể khác nhau: gỗ, đá pumice, đá pumice với gỗ tỉ lệ 1: 1. Cây được đặt trong nhà lưới có mái che, lưới che nắng có khả năng tán xạ ánh sáng, phủ nilông giữ ẩm. Thời gian theo dõi 4 tuần.

Điều kiện thí nghiệm: Mẫu được nuôi cấy dưới ánh đèn neon với cường độ ánh sáng từ 2.000-

25.000 lux, thời gian chiếu sáng 8 - 10 giờ/ngày; nhiệt độ $25 \pm 20^\circ\text{C}$; độ ẩm 60 - 70%.

Các chỉ tiêu theo dõi:

Tỷ lệ mẫu sống không nhiễm (%) = $\frac{\text{Số mẫu sống không nhiễm}}{\text{tổng số mẫu}} \times 100$.

Hệ số nhân chồi (lần) = $\frac{\text{Số chồi thu được}}{\text{tổng số chồi ban đầu}}$.

Hệ số ra rễ = $\frac{\text{Số rễ thu được}}{\text{tổng số chồi ban đầu}}$.

Tỷ lệ cây sống (%) = $\frac{\text{Số cây sống}}{\text{tổng số cây trồng}} \times 100$.

Xử lý số liệu: Các số liệu thu thập được thống kê và xử lý bằng phần mềm Microsoft office Excel 2019 và IRRISTAT 5.0.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khử trùng mẫu cấy

Khử trùng mẫu là bước đầu tiên và quan trọng, nhằm tạo ra vật liệu khởi đầu vô trùng trong kỹ thuật nuôi cấy mô thực vật *in vitro*. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng dung dịch bằng HgCl_2 0,1% được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng HgCl_2 đến khả năng tạo mẫu vô trùng (sau 2 tuần theo dõi)

Công thức (CT)	CT1 (Đối chứng)	CT2	CT3	CT4	CT5	CT6
Thời gian khử trùng (Phút)	0	5	10	15	20	25
Tỷ lệ mẫu sống không nhiễm (%)	0	6,67	23,33	40	66,67	53,33

Sau 2 tuần nuôi cấy, tất cả các CT có sử dụng HgCl_2 0,1% đều có tỷ lệ mẫu sống không nhiễm cao hơn so với CT1 (Đối chứng). Tỷ lệ mẫu sống không nhiễm tăng dần khi thời gian khử trùng tăng, đạt cao nhất là 66,67% ở 20 phút (CT5). Khi

thời gian khử trùng tăng lên 25 phút (CT6), tỷ lệ mẫu sống không nhiễm giảm còn 53,33%. Có thể thấy rằng, nếu khử trùng với thời gian quá 20 phút, tác dụng gây độc của HgCl_2 0,1% có thể gây ảnh hưởng tới tiêu cực tới mẫu.



Hình 1. Hạt lan kiểm không nhiễm sau 2 tuần nuôi cấy (A) và nảy mầm trên môi trường MS sau 25 ngày (B) và 30 ngày (C)

3.2. Lựa chọn môi trường nền

Kết quả theo dõi mẫu lan kiểm Ba Bể được nuôi cấy trong môi trường MS có nồng độ khác nhau sau 4 tuần nuôi cấy được thể hiện ở bảng 2.

Xét về chỉ tiêu hệ số nhân chồi với giá trị $\text{LSD}_{0,05}$ là 0,117, các CT đều có sự sai khác có ý

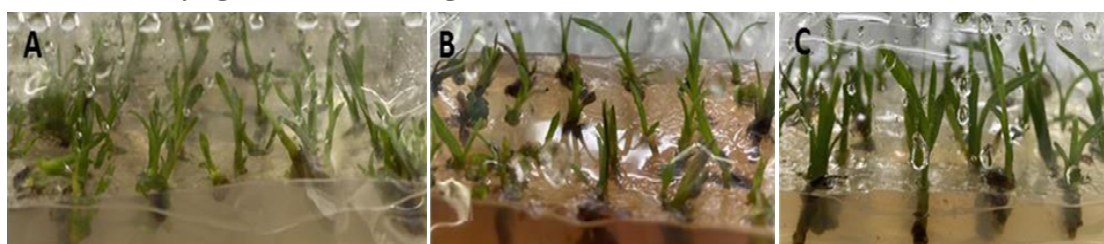
nghĩa so với CT1 (Đối chứng) ở mức độ tin cậy 95%. CT1 (Đối chứng) cho hệ số nhân chồi cao nhất là 1,69. Các CT2, CT3, CT4 cho hệ số nhân chồi giảm dần, lần lượt là 1,13; 0,96; 0,72. Với chỉ tiêu chất lượng chồi, quan sát thấy ở CT1 (Đối chứng) cho chồi xanh đậm, mập, các CT2, CT3, CT4 cho chồi sinh trưởng yếu hơn, màu xanh nhạt,

nhỏ, khác biệt rõ rệt so với CT1 (Đối chứng). Từ (CT1 - Đối chứng) thích hợp để làm môi trường các kết quả này có thể thấy rằng, môi trường MS nền cho nuôi cấy lan kiếm Ba Bể.

Bảng 2. Kết quả ảnh hưởng của môi trường nền đến hiệu quả nhân giống cây lan kiếm Ba Bể (sau 4 tuần nuôi cấy)

CT	Môi trường	Số mẫu (mẫu)	Tổng số chồi (chồi)	Hệ số nhân chồi	Hình thái chồi
CT1 (Đối chứng)	MS	90	153	1,69	Xanh đậm, mập
CT2	1/2MS	90	102	1,13*	Xanh nhạt, nhỏ
CT3	1/3MS	90	87	0,96*	Xanh nhạt, nhỏ
CT4	1/4MS	90	65	0,72*	Xanh nhạt, nhỏ
LSD _{0,05}				0,117	
CV%				5,5	

*Ghi chú: *: Có ý nghĩa so với đối chứng*



Hình 2. Ảnh hưởng của môi trường nền đến hiệu quả nhân giống lan kiếm Ba Bể (A- MS, B- 1/2MS, C- 1/3MS)

3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng nước dừa đến khả năng nhân nhanh mẫu

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của việc bổ sung nước dừa ở các nồng độ khác nhau tới khả năng nhân nhanh mẫu được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng tái sinh và nhân nhanh mẫu cây lan kiếm Ba Bể (sau 4 tuần nuôi cấy)

CT	Nồng độ nước dừa (ml/l)	Số mẫu (mẫu)	Tổng số chồi (chồi)	Hệ số nhân chồi	Hình thái chồi
CT1 (Đối chứng)	0	90	155	1,72	Xanh đậm, mập
CT2	10	90	178	1,98*	Xanh đậm, mập
CT3	20	90	211	2,34*	Xanh đậm, mập
CT4	50	90	254	2,82*	Xanh đậm, mập

KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

CT5	100	90	303	3,37*	Xanh đậm, mập
LSD _{0,05}				0,1391	
CV%				3,1	

*Ghi chú: *: Có ý nghĩa so với đối chứng*

Với chỉ tiêu hệ số nhân chồi với giá trị LSD_{0,05} là 0,1391; các CT có sự sai khác có ý nghĩa so với CT1 (Đối chứng) ở mức độ tin cậy 95%. Tất cả các CT2, CT3, CT4, CT5 đều cho hệ số nhân chồi cao hơn so với CT1 (Đối chứng) và tăng dần theo nồng độ nước dừa, lần lượt là 1,98; 2,34; 2,82; 3,37 lần. Chất lượng chồi khá đồng đều ở tất cả các CT. CT5 (100 ml/l nước dừa) cho hệ số nhân chồi cao nhất là 3,37. Điều này có thể giải thích là do nước dừa chứa các axit amin, axit hữu cơ, axit nucleic, một

số loại vitamin, auxin, cytokinin, khoáng chất và các chất khác có khả năng thúc đẩy sự phát triển chồi của cây *in vitro* [6]. Như vậy, giới hạn trong thí nghiệm này, bổ sung 100 ml nước dừa vào môi trường MS có hiệu quả nhất trong việc tăng hệ số nhân chồi lan kiểm Ba Bể.

3.4. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân nhanh chồi

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân nhanh chồi được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng nhân nhanh chồi cây lan kiểm Ba Bể (sau 4 tuần nuôi cấy)

CT	Nồng độ BAP (mg/l)	Số mẫu (mẫu)	Tổng số chồi (chồi)	Hệ số nhân chồi	Hình thái chồi
CT1 (Đối chứng)	0	90	146	1,62	Xanh đậm, mập
CT2	0,5	90	218	2,42*	Xanh đậm, mập
CT3	1	90	339	3,76*	Xanh đậm, mập
CT4	1,5	90	300	3,33*	Xanh đậm, mập
CT5	2	90	281	3,12*	Xanh đậm, mập
LSD _{0,05}				0,1581	
CV%				3,0	

*Ghi chú: *: Có ý nghĩa so với đối chứng*

Xét về chỉ tiêu hệ số nhân chồi với giá trị LSD_{0,05} là 0,1581, các CT đều có sự sai khác có ý nghĩa so với CT1 (Đối chứng) ở mức độ tin cậy

95% và đều cho hệ số nhân chồi cao hơn so với CT1 (Đối chứng). Hệ số nhân chồi tăng dần từ CT2, CT3 và giảm dần ở CT4, CT5. Mẫu nuôi cấy ở

CT3 (1 mg/l BAP) cho hệ số nhân chồi cao nhất là 3,76. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu quy trình nhân nhanh lan *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. của Kumar và cs (2022) [7] và nghiên cứu về loài lan cùng chi khác là lan Bạch Ngọc Đuôi Công

(*Cymbidium wenshanense*) của Phạm Phương Thu và cs (2023) [8].

3.5. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của kinetin đến khả năng nhân nhanh chồi

Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ kinetin đến khả năng nhân nhanh chồi cây lan kiếm Ba Bể (sau 4 tuần nuôi cấy)

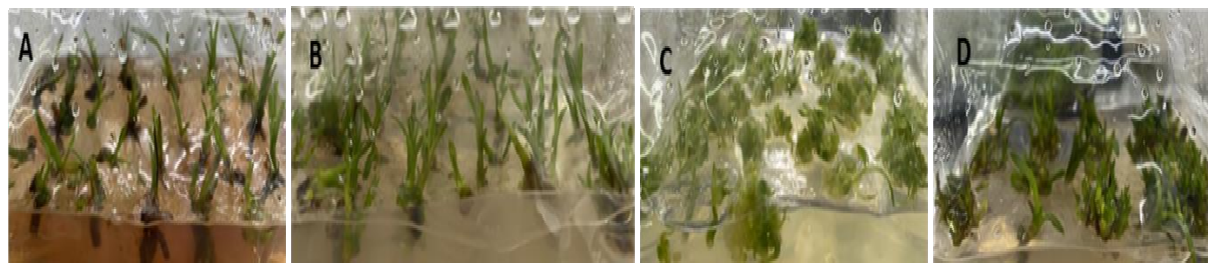
CT	Nồng độ kinetin (mg/l)	Số mẫu (mẫu)	Tổng số chồi (chồi)	Hệ số nhân chồi	Hình thái chồi
CT1 (Đối chứng)	0	90	148	1,64	Xanh đậm, mập
CT2	0,5	90	212	2,36*	Xanh đậm, mập
CT3	1	90	244	2,71*	Xanh đậm, mập
CT4	1,5	90	317	3,52*	Xanh đậm, mập
CT5	2	90	275	3,06*	Xanh đậm, mập
LSD _{0,05}				0,1319	
CV%				2,7	

Ghi chú: *: Có ý nghĩa so với đối chứng

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của kinetin đến khả năng nhân nhanh chồi được trình bày trong bảng 5.

Xét về chỉ tiêu hệ số nhân chồi với giá trị LSD_{0,05} là 0,1319, các CT đều có sự sai khác có ý nghĩa so với CT1 (Đối chứng) ở mức độ tin cậy 95% và cho hệ số nhân chồi cao hơn so với CT1

(Đối chứng). Hệ số nhân chồi tăng dần từ CT2, CT3, CT4. Mẫu nuôi cấy ở CT4 (1,5 mg/l kinetin) cho hệ số nhân chồi cao nhất là 3,52. Khi vượt quá nồng độ 1,5 mg/l kinetin, hệ số nhân chồi giảm. Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của Hoàng Thị Nga và cs (2008) trên giống địa lan Hồng Hoàng (*Cymbidium iridioides*) [9].



Hình 3. Ảnh hưởng của BAP, kinetin, nước dừa đến khả năng nhân chồi lan kiếm Ba Bể
A- Đối chứng, B- kinetin 1,5 mg/l, C- BAP 1 mg/l, D- nước dừa 100 ml/l

3.6. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ NAA đến khả năng ra rễ

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng NAA đến khả năng ra rễ của chồi cây lan kiếm Ba Bể được thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ NAA đến khả năng ra rễ của chồi cây lan kiếm Ba Bể (sau 4 tuần nuôi cấy)

CT	Nồng độ NAA (mg/l)	Tổng số mẫu (mẫu)	Tổng số rễ (rễ)	Hệ số ra rễ	Hình thái rễ
CT1 (đối chứng)	0	90	42	0,47	Ngắn, nhỏ
CT2	0,5	90	230	2,56*	Dài, mập
CT3	1	90	269	2,99*	Dài, mập
CT4	1,5	90	335	3,72*	Dài, mập
CT5	2	90	286	3,18*	Dài, mập
LSD _{0,05}				0,1281	
CV%				2,7	

*Ghi chú: *: có ý nghĩa so với đối chứng*

Với giá trị LSD_{0,05} là 0,1281, các CT bổ sung NAA đều có sự sai khác có ý nghĩa so với CT1 (Đối chứng) ở mức độ tin cậy 95% và có hệ số ra rễ cao hơn so với CT1 (Đối chứng). Hệ số ra rễ tăng dần từ CT2, CT3 đến CT4 và đạt hệ số cao nhất tại CT4 (1,5 mg/l NAA) là 3,72. Tại CT5 (2 mg/l NAA) hệ số ra rễ giảm. Hiện tượng này có thể được giải thích bởi nồng độ cao của auxin, dẫn đến sự ức chế quá trình giãn dài tế bào, gây ảnh hưởng đến cấu trúc rễ và làm chậm hoặc cản trở quá trình phát triển của hệ rễ [10]. Với chỉ tiêu chất lượng

rễ: Các CT cho chất lượng rễ tương đối đồng đều: dài, mập so với CT1 (Đối chứng). Như vậy trong khuôn khổ thí nghiệm này, để nâng cao hệ số ra rễ cần bổ sung 1,5 mg/l NAA.

3.7. Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của than hoạt tính kết hợp với NAA đến khả năng ra rễ

Kết quả kiểm tra ảnh hưởng của nồng độ than hoạt tính (THT) phù hợp nhất cho việc nhân nhanh cây lan kiếm Ba Bể được thể hiện ở bảng 7.

Bảng 7. Kết quả ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng ra rễ của chồi (sau 4 tuần theo dõi)

CT	Nồng độ NAA (mg/l)	Nồng độ THT (g/l)	Tổng số mẫu (mẫu)	Tổng số rễ (mẫu)	Hệ số ra rễ	Hình thái rễ
CT1 (Đối chứng)	1,5	0,0	90	334	3,71	Ngắn, mập
CT2		0,5	90	354	3,93*	Ngắn, mập

CT3		1,0	90	396	4,4*	Dài, mập
CT4		1,5	90	380	4,22*	Dài, mập
CT5		2,0	90	364	4,04*	Dài, mập
LSD _{0,05}					0,1409	
CV%					1,9	

*Ghi chú: * *: Có ý nghĩa so với đối chứng*

Môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l NAA và than hoạt tính từ 0,0 - 2,0 g/l có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng ra rễ của cây lan kiếm Ba Bể. Với giá trị LSD_{0,05} là 0,1409 thì các CT trong thí nghiệm đều có sự sai khác có ý nghĩa so với CT1 (Đối chứng) ở mức độ tin cậy 95%. Các CT có bổ sung THT vào môi trường nuôi cấy đều cho hệ số ra rễ cao hơn so với CT1 (Đối chứng) không

bổ sung THT. CT3 với hàm lượng THT 1 g/l cho hệ số ra rễ cao nhất là 4,4. Lượng than hoạt tính tăng lên ở CT4 và CT5 khiến cho hệ số ra rễ có xu hướng giảm dần. Về chỉ tiêu hình thái rễ: các CT1 (Đối chứng), CT2 và CT5 cho rễ ngắn, mập; CT3 và CT4 cho rễ dài và mập. Như vậy, tỉ lệ than hoạt tính tốt nhất cho việc ra rễ cây lan kiếm Ba Bể là 1 g/l.



Hình 4. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng ra rễ của lan kiếm Ba Bể

(A- than hoạt tính 0,5 g/l, B- than hoạt tính 1,0 g/l, C- than hoạt tính 1,5 g/l, D- than hoạt tính 2,0 g/l)

3.8. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của giá thể ra cây đến tỉ lệ sống sót của cây

Đưa cây ra vườn ươm là công đoạn cuối cùng để hoàn thành quy trình nhân giống *in vitro*. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của giá thể ra cây đến tỉ lệ sống sót của cây được thể hiện ở bảng 8.

Các CT đều cho tỉ lệ sống sót cao trên 75% và CT3 cho tỉ lệ sống sót cao nhất đến 93,33%. Như vậy khuôn khổ của thí nghiệm cho thấy, giá thể tốt nhất cho cây lan kiếm Ba Bể là giá thể gồm gỗ kết hợp với đá bọt pumice (1: 1), hai loại giá thể này có công dụng thoát nước rất tốt, thoáng khí, phù hợp để làm giá thể cho cây lan kiếm Ba Bể.

Bảng 8. Kết quả ảnh hưởng của giá thể ra cây đến tỉ lệ sống sót của cây lan kiếm Ba Bể (sau 4 tuần theo dõi)

CT	Loại giá thể	Tổng số cây (cây)	Tổng số cây sống sót (cây)	Tỷ lệ cây sống sót (%)
CT1	Gỗ	30	23	76,67
CT2	Đá bọt	30	25	83,33
CT3	Đá bọt + gỗ	30	28	93,33

4. KẾT LUẬN

Khử trùng quả lan kiếm Ba Bể bằng dung dịch HgCl_2 0,1% trong 20 phút cho kết quả tốt nhất với tỉ lệ mẫu sống không nhiễm là 66,67%.

Môi trường nền thích hợp cho nhân giống cây lan kiếm Ba Bể là môi trường MS + đường 30 g/l + agar 5,5 g/l; pH = 5,6 - 5,8; cho hệ số nhân chồi đạt 1,69.

Bổ sung thêm nước dừa, BAP hoặc kinetin vào môi trường nền ở các nồng độ thích hợp thì đều giúp tăng hiệu quả nhân nhanh mẫu lan kiếm Ba Bể. Trong đó: Nồng độ nước dừa tối ưu là 100 ml/l cho hệ số nhân chồi đạt 3,37; nồng độ BAP tối ưu là 1 mg/l cho hệ số nhân chồi đạt 3,76; nồng độ kinetin tối ưu là 1,5 mg/l cho hệ số nhân chồi đạt 3,52.

Giai đoạn ra rễ, mẫu nuôi cấy trên môi trường nền bổ sung NAA 1,5 mg/l cho hệ số nhân rễ đạt 3,72. Khi bổ sung thêm than hoạt tính 1 g/l, mẫu nuôi cấy trên môi trường MS + NAA 1,5 mg/l + THT 1 g/l + đường 30 g/l + agar 5,5 g/l, pH = 5,6 - 5,8, cho hệ số nhân rễ tối ưu đạt 4,4.

Trong khuôn khổ thí nghiệm, giá thể tốt nhất cho lan kiếm Ba Bể là giá thể bao gồm gỗ và đá bọt pumice (1: 1), với tỉ lệ cây sống sót là 93,33%.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã tài trợ cho nghiên cứu này trong khuôn khổ đề tài cấp quốc gia “Nghiên cứu phát triển sản phẩm nông lâm nghiệp đặc thù theo chuỗi giá trị phục vụ du lịch khu vực hồ Ba Bể và vùng phụ cận”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hossain, Mohammad Musharof. (2011). Therapeutic orchids: Traditional uses and recent advances - an overview. *Fitoterapia*, 82, 2, 102 - 140.
2. M. Paul, T. I., R. H. Sarker and M. I. Hoque. (2019). *In vitro* Mass Propagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 29, 73 - 79.
3. A. Kumar, S. C., S. Rattan, A. R. Warghat, D. Kumar and B. Bhargava. (2022). *In vitro* propagation and phyto - chemical assessment of

Cymbidium aloifolium (L.) Sw.: An orchid of pharma - horticultural importance. *South African Journal of Botany*, 144, 261 - 269.

4. Nguyễn Thị Diệp, Huỳnh Thị Kim (2020). Nghiên cứu xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* lan kiếm Phan Trí (*Cymbidium finlaysonianum* Lindl.). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Thái Nguyên*, 225, 08, 479 - 486.

5. Nguyễn Văn Tiến, Đặng Văn Đông, Chu Thị Ngọc Mỹ, Nguyễn Văn Tĩnh, Dương Văn Minh (2020). Hoàn thiện quy trình nhân giống Lan kiếm thanh ngọc (*Cymbidium sinense* var *alba*) bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 9, 88 - 93.

6. Khoirista Noor Rohmah, Worasitikulya Taratima. (2022). Effect of chitosan, coconut water and potato extract on protocorm growth and plantlet regeneration of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. *Current Applied Science and Technology*, 22, 1 - 10.

7. Kumar, A., Chauhan, S., Rattan, S., Warghat, A. R., Kumar, D., Bhargava, B. (2022). *In vitro* propagation and phyto - chemical assessment of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.: An orchid of pharma - horticultural importance. *South African Journal of Botany*, 144, 261 - 269.

8. Phạm Phương Thu, Nguyễn Thị Tĩnh, Ngô Xuân Bình, Trần Ngọc Hùng (2023). Nghiên cứu khả năng tái sinh chồi địa lan Bạch Ngọc Đuôi Công (*Cymbidium wenshanense*) bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, tập 65, số 5, 55 - 58.

9. Hoàng Thị Nga, Nguyễn Quang Thạch, Đỗ Đức Thịnh, Hoàng Minh Tú (2008). Xây dựng quy trình nhân nhanh giống địa lan hồng hoàng (*Cymbidium iridoides*) bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 5, 387 - 394.

10. Jie Yu, Wu Liu, Jie Liu, Peng Qin, Lin Xu. (2017). *Auxin control of root organogenesis from callus in tissue culture*. *Frontiers in plant science*, 8, 1385 - 1389.

IN VITRO PROPAGATION OF BA BE CYMBIDIUM ORCHID (*Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.)

Nguyen Dac Binh Minh¹, Nguyen Duc Huy², Nguyen Tien Dung³,
Chu Huy Tuong¹, Phan Thi Khanh Linh¹, Dao Thuy Duong¹

¹ *Institute of Regional Research and Development*

² *Master student, Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry*

³ *Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry*

Summary

This study aims to develop an in vitro propagation protocol for the Ba Be Cymbidium orchid (*Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.) to contribute to the conservation of this species, provide a basis for related research and supply orchid seedlings to the market. Orchid capsules were cleaned and sterilized with 0.1% HgCl₂ solution for 20 minutes, resulting in a contamination - free survival rate of 66.67%. The optimal basal medium for propagation was MS + 30 g/L sucrose + 5.5 g/L agar, pH 5.6 - 5.8, achieving a shoot multiplication coefficient of 1.69. To enhance the efficiency of shoot multiplication, the basal medium was supplemented with the following: Coconut water (100 ml/L), resulting in a shoot multiplication coefficient of 3.37; BAP (1 mg/L), achieving a coefficient of 3.76; kinetin (1.5 mg/L), yielding a coefficient of 3.52. During the rooting stage, culture samples grown on a basal medium supplemented with 1.5 mg/L NAA achieved a root multiplication coefficient of 3.72. The addition of 1 g/L activated charcoal (AC) to the medium containing 1.5 mg/L NAA further optimized the root multiplication coefficient, reaching 4.4. The best substrate for acclimatizing *in vitro* seedlings was a mixture of wood and pumice (1: 1), achieving a survival rate of 93.33%.

Keywords: *In vitro*, *Cymbidium aloifolium*, micropropagation.

Ngày nhận bài: 20/01/2025

Ngày chuyển phản biện: 12/02/2025

Ngày thông qua phản biện: 27/02/2025

Ngày duyệt đăng: 12/3/2025