

HOÀN THIỆN QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ NHÂN GIỐNG HOA LAN HOÀNG THẢO BẰNG CÔNG NGHỆ NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO

Nguyễn Văn Tiến¹*, Nguyễn Thị Huệ¹, Dương Văn Minh¹, Nguyễn Văn Tĩnh¹, Định Thị Dinh¹

¹ Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Hoa cây cảnh, Viện Nghiên cứu Rau quả

* Email: nguyenvantien1011@gmail.com

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* lan hoàng thảo Den 08.5.2. đã được thực hiện. Kết quả nghiên cứu cho thấy: Vật liệu khởi đầu là chồi non *in vivo* được khử trùng bằng dung dịch nano bạc ở nồng độ 150 ppm trong 45 phút cho hiệu quả khử trùng tốt nhất và cao hơn công thức đối chứng với tỉ lệ mẫu sạch là 78,89%, tỉ lệ mẫu sạch và sống đạt 72,22%, thời gian phát sinh hình thái là 17,3 ngày. Môi trường nhân nhanh tối ưu là 2,5 g/L hyponex + 0,5 mg/L BAP + 0,2 mg/L α -NAA + 0,2 g/L than hoạt tính (THT) + 100 ml/L nước dừa đóng hộp (NDH) + 15 mg/L chitosan với hệ số nhân đạt 4,3 chồi/mẫu, chiều cao chồi 2,2 cm, khối lượng cụm chồi là 0,93 g/cụm, chồi xanh mập. Môi trường tạo cây hoàn chỉnh thích hợp là 2,5 g/L hyponex + 0,5 mg/L α -NAA + 0,3 g/L THT + 7,5 g/L bột chuối tiêu (BCT) với số rễ/cây đạt 5,38 rễ, chiều dài rễ là 4,17 cm, chiều cao cây 5,75 cm, số lá trên cây là 3,56 lá. Giai đoạn ra ngôi cây con lan hoàng thảo được ra ngôi trên giá thể dớn đạt hiệu quả tối ưu với tỷ lệ cây sống đạt 98,8% với chiều cao cây đạt 7,82 cm, khối lượng cây là 1,51 g/cây, tỷ lệ xuất vườn là 91,11%.

Từ khóa: *In vitro*, *Dendrobium*, Den 08.5.2, nhân giống.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan hoàng thảo (*Dendrobium*) đem lại hiệu quả kinh tế cao đối với ngành sản xuất hoa lan của một số nước trên thế giới. Những năm gần đây, nhờ việc mở rộng phát triển sản xuất các loài lan này đã đem lại nguồn lợi nhuận kinh tế đáng kể cho các nước như: Thái Lan, Singapore, Trung Quốc... [1]. Trong gần 20 năm trở lại đây, Việt Nam đã nhập nội hàng trăm giống lan hoàng thảo và được sản xuất nhiều tại thành phố Hồ Chí Minh và các tỉnh phía Nam. Tính đến năm 2019, diện tích sản xuất ước đạt 149 ha (tăng 49% so với năm 2015), tuy nhiên hàng năm nước ta vẫn phải nhập trên 20 triệu cành do sản xuất vẫn chưa đáp ứng đủ cho nhu cầu thị trường trong nước. Mặt khác, giống hoa lan hoàng thảo đang được sản xuất kinh doanh ở nước ta hiện nay hầu hết là các giống nhập nội [2, 3].

Trước tình hình đó, trong những năm gần đây Viện Nghiên cứu Rau quả đã phối hợp với Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam nghiên cứu chọn tạo ra nhiều giống hoa lan hoàng thảo mới, trong đó có giống Den 08.5.2 được chọn

lọc từ tổ hợp lai Kasem gold (cây bố) x Manmado (cây mẹ)... có nhiều ưu điểm tốt như: Sinh trưởng, phát triển khỏe, màu sắc đẹp, mới lạ, số hoa trên cành nhiều, năng suất cao và ổn định (4 - 5 cành/chậu/năm), phù hợp với thị hiếu của người tiêu dùng, do vậy cần được quan tâm phát triển rộng ra sản xuất.

Để sản xuất thành hàng hóa với số lượng lớn cây giống lan hoàng thảo có chất lượng tốt, đồng nhất về di truyền, tỷ lệ biến dị thấp thì việc áp dụng phương pháp nhân giống *in vitro* là phương pháp bắt buộc hiện nay. Giai đoạn năm 2011 - 2015 Viện Nghiên cứu Rau quả phối hợp với Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam đã nghiên cứu xây dựng quy trình nhân giống hoa lan hoàng thảo bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào. Tuy nhiên, quy trình mới dừng lại ở quy mô phòng thí nghiệm và vẫn còn bộc lộ nhiều hạn chế như: Hóa chất khử trùng còn độc hại cho con người và mẫu cấy; môi trường nuôi cấy chưa tối ưu cho sự sinh trưởng, phát triển của mẫu, tỷ lệ cây đạt tiêu chuẩn ra ngôi thấp; một số hóa chất và nguyên vật liệu sử dụng chưa phù hợp với quy mô sản xuất hàng hóa.

Chính vì vậy, nghiên cứu hoàn thiện quy trình công nghệ nhân giống hoa lan hoàng thảo bằng công nghệ nuôi cấy mô tế bào là cần thiết nhằm giải quyết một số tồn tại nêu trên.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Giai đoạn vào mẫu: Sử dụng chồi non *in vivo* 6 - 8 cm sạch bệnh giống Den 08.5.2 (CF.22.03) do Viện Nghiên cứu Rau quả và Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam nghiên cứu chọn tạo. Giai đoạn nhân nhanh: Sử dụng các chồi *in vitro* có kích thước đồng đều 1,5 - 2 cm, chồi xanh mập. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh: Sử dụng chồi *in vitro* có kích thước đồng đều 2 - 2,5 cm sinh trưởng và phát triển tốt. Giai đoạn ra ngôi: Sử dụng cây con có 5 - 6 rễ, 3 - 4 lá, cao 5 - 6 cm, lá xanh đậm và mập.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Môi trường nuôi cấy được hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút ở áp suất 1 atm. Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (Complete Randomized Design - CRD), 3 lần nhắc lại. Mỗi lần nhắc lại 30 mẫu/công thức được đo đếm và quan sát định kỳ 2 tuần/lần.

Khử trùng mẫu cấy: Vật liệu nghiên cứu là chồi non *in vivo* 6 - 8 cm. Mẫu được rửa sạch đất, bụi bằng vòi nước máy trong 5 phút, sau đó ngâm trong nước xà phòng loãng (lắc nhẹ 30 phút), rửa sạch lại dưới vòi nước cho hết sạch xà phòng. Mẫu được khử trùng bề mặt trong cồn 70% khoảng 30 giây. Tiến hành khử trùng mẫu bằng nano bạc với 4 nồng độ khác nhau trong 45 phút và công thức đối chứng (ĐC) khử trùng bằng $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 10% trong 15 phút. Sau đó rửa sạch nhiều lần bằng nước cất vô trùng rồi cấy vào môi trường vào mẫu. Theo dõi mẫu sau 4 tuần khử trùng, kiểm tra mẫu sạch và sống.

Nhân nhanh chồi: Sử dụng các chồi *in vitro* có kích thước đồng đều 1 - 1,5 cm nuôi cấy trên môi trường có nền khoáng MS, hyponex các nồng độ khác nhau và kết hợp với nước dừa đóng hộp hàm lượng khác nhau có bổ sung 0,5 mg/L BAP, 0,2 mg/L α -NAA, 30 g/L đường sucrose, 0,2 mg/L THT, 15 mg/L chitosan, 6,5 mg/L agar, pH= 5,5 - 5,7. Các chỉ tiêu hệ số nhân chồi, chiều cao cụm

chồi, khối lượng cụm chồi và đường kính chồi được theo dõi sau 6 tuần nuôi cấy.

Tạo cây hoàn chỉnh: Sử dụng các chồi có kích thước đồng đều 2 - 2,5 cm nuôi cấy trên môi trường nền khoáng 2,5 g/L hyponex có bổ sung 0,5 mg/L α -NAA, 30 g/L đường sucrose, 0,3 g/L THT, 6,5 g/L agar, pH = 5,5 - 5,7 và các công thức có bổ sung riêng lẻ BCT với nồng độ khác nhau từ 0 - 10 g/L. Các chỉ tiêu thời gian phát sinh rễ, số lá/cây, chiều cao cây, số rễ và chiều dài rễ trên cây được theo dõi sau 8 tuần nuôi cấy.

Giai đoạn ra ngôi cây con: Cây con đủ tiêu chuẩn ra ngôi sau khi huấn luyện tiến hành ra ngôi với các loại giá thể khác nhau là bột xơ dừa, dớn, vỏ thông. Các chỉ tiêu tỷ lệ sống, tỷ lệ xuất vườn, số lá/cây, chiều dài lá, chiều rộng lá và chất lượng cây giống được theo dõi sau 6 tháng nuôi trồng.

Điều kiện nuôi cấy trong phòng: Nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$; độ ẩm 60 - 70%; quang chu kỳ tự động 16 giờ chiếu sáng/ngày; cường độ chiếu sáng 2.200 - 2.500 lux.

Cây con được ra ngôi trong điều kiện vườn ươm: Nhiệt độ 22 - 25°C, độ ẩm 80 - 90%, cường độ chiếu sáng 5.000 - 7.000 lux. Cây con ra ngôi trong chậu kích thước 5 x 5 cm. Sau 30 ra ngôi, rễ bắt đầu phát triển phun phân tím với nồng độ 0,5 g/lít, kết hợp với growroot.

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng chương trình Excel, IRRISTAT 4.0.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của hóa chất khử trùng đến tỷ lệ mẫu sạch và khả năng phát sinh hình thái

Việc sử dụng các hóa chất khử trùng như HgCl_2 và $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ gây ô nhiễm môi trường và gây độc cho con người và các sinh vật khác [4]. Hiện nay các nhà khoa học đã có nhiều nghiên cứu và ứng dụng nano bạc vào trong thực tế. Nano bạc được cho là an toàn và có thể sử dụng lâu dài với thực vật cũng như con người. Các hợp chất nano cũng được sử dụng hiệu quả trong việc khử trùng mẫu nuôi cấy mô tế bào thực vật [5 - 7]. Nghiên cứu tiến hành thí nghiệm nhằm đánh giá nồng độ nano bạc khử trùng thích hợp để tiêu diệt nấm, vi

khuẩn đồng thời không làm chết mẫu nuôi cấy. Sau tuần 4 theo dõi kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1 cho thấy, tỷ lệ mẫu sạch có tỷ lệ thuận với nồng độ nano bạc từ 57,78 – 80,00% và cao hơn ở công thức đối chứng với 55,56%. Khi nồng độ nano bạc tăng lên thì tỷ lệ mẫu sạch và sống cũng tăng từ 47,78 - 72,22% và cao hơn ở công thức đối chứng với 50,00%. Nhưng khi nồng độ nano bạc tăng cao nhất ở ngưỡng 175 ppm thì tỷ lệ mẫu sạch và sống lại giảm còn 55,56% mặc dù tỷ lệ mẫu sạch đạt cao nhất 80,00%. Thời gian phát sinh hình thái giao động từ 16,2 - 20,4 ngày, dài

nhất ở công thức có nồng độ nano bạc cao nhất 175 ppm là 20 ngày. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sử dụng nồng độ nano bạc ở mức cao 175 ppm cho tỷ lệ mẫu sạch cao, nhưng lại làm mẫu khử trùng bị tổn thương; sử dụng nano bạc ở nồng độ 150 ppm khử trùng, trong 45 phút cho tỷ lệ mẫu sạch và sống cao nhất. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Bùi Thị Thanh Phương và Nguyễn Phương Lan (2020) [5] khi đánh giá vật liệu nano bạc có tác dụng khử trùng vào mẫu cây Trầu tiên với nồng độ nano bạc là 150 ppm, trong 40 phút.

Bảng 1. Hóa chất khử trùng đến tỷ lệ mẫu sạch và khả năng phát sinh hình thái

(Kết quả sau 4 tuần khử trùng)

Công thức	Chỉ tiêu	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu sạch và sống (%)	Thời gian PSHT (ngày)
CT1: Ca(ClO ₂) 10%, 15 phút (ĐC)		55,56	50,00	17,4
CT2: nAg 100 ppm, 45 phút		57,78	47,78	16,2
CT3: nAg 125 ppm, 45 phút		67,78	62,22	16,5
CT4: nAg 150 ppm, 45 phút		78,89	72,22	17,3
CT5: nAg 175 ppm, 45 phút		80,00	55,56	20,4

Ghi chú: PSHT là phát sinh hình thái; môi trường nền 0,3 mg/L BAP + 0,2 mg/L α-NAA + 30 g/L đường sucrose + 0,2 g/L THT + 6,5 g/L agar.

Như vậy, khi sử dụng nano bạc ở nồng độ 150 ppm, trong 45 phút cho hiệu quả tốt nhất và cao hơn công thức đối chứng với tỷ lệ mẫu sạch là

78,89%, tỉ lệ mẫu sạch và sống đạt 72,22%, thời gian phát sinh hình thái là 17,3 ngày.

3.2. Ảnh hưởng của môi trường nền đến khả năng nhân nhanh và chất lượng cụm chồi.

Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường nền đến khả năng nhân nhanh và chất lượng cụm chồi

(Kết quả sau 6 tuần nuôi cấy)

Công thức	Chỉ tiêu	Hệ số nhân chồi (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Khối lượng cụm chồi (g)	Đường kính chồi (cm)
CT1: MS (ĐC)		3,0 ^b	2,0 ^{ns}	0,53 ^b	0,30 ^b
CT2: Hyponex 1,5 g/l		3,1 ^b	2,1 ^{ns}	0,52 ^b	0,31 ^{ab}
CT3: Hyponex 2,0 g/l		3,2 ^b	2,0 ^{ns}	0,57 ^{ab}	0,31 ^{ab}
CT4: Hyponex 2,5 g/l		3,6 ^a	2,1 ^{ns}	0,67 ^a	0,33 ^a
CT5: Hyponex 3,0 g/l		3,8 ^a	2,1 ^{ns}	0,63 ^{ab}	0,32 ^{ab}
CV%		4,2	3,1	4,0	3,5
LSD _{0,05}		0,27	0,12	0,13	0,02

Ghi chú: Môi trường nền 0,5 mg/L BAP + 0,2 mg/L α-NAA + 30 g/L đường sucrose + 0,2 g/L THT + 15 mg/L chitosan + 6,5 g/L agar; trong cùng một cột số liệu, các giá trị mang cùng chữ cái là thể hiện sự sai khác không có ý nghĩa thống kê và ngược lại theo tiêu chuẩn LSD ở mức ý nghĩa α=0,05.

Nhằm nghiên cứu thay thế môi trường nền khoáng MS bằng hyponex, tạo điều kiện thuận lợi khi sản xuất ở quy mô công nghiệp. Nghiên cứu tiến hành thí nghiệm ảnh hưởng của môi trường nền MS (ĐC) và hyponex ở các nồng độ khác nhau đến khả năng nhân nhanh và chất lượng cụm chồi. Kết quả sau 6 tuần nuôi cấy được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2 cho thấy, khi bổ sung hyponex vào môi trường nuôi cấy giai đoạn nhân nhanh có sự sai khác có ý nghĩa về chỉ tiêu hệ số nhân, khối lượng cụm chồi và đường kính chồi. Có thể thấy, khi sử dụng môi trường nền hyponex thay thế MS cho kết quả hệ số nhân chồi và chất lượng chồi cao hơn. Khi hàm lượng hyponex là 2,5 g/L thì chồi có đặc điểm xanh, mập với hệ số nhân chồi là 3,6 chồi, chiều cao chồi là 2,1 cm, khối lượng cụm chồi đạt 0,67 g và đường kính chồi là 0,33 cm.

Như vậy, trong giai đoạn nhân nhanh lan Den 08.5.2 có thể sử dụng hyponex với hàm lượng 2,5 g/L là môi trường nền khoáng giúp chồi phát triển tối ưu.

3.3. Ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng nhân nhanh và chất lượng cụm chồi

Trong môi trường nuôi cấy mô các giống lan, bên cạnh các thành phần muối, vitamin, nguồn các-bon và chất điều hòa sinh trưởng còn có một thành phần quan trọng được thêm vào môi trường nuôi cấy là các chất hữu cơ như nước dừa, chuối, khoai tây... Đặc biệt là nước dừa đã được nhiều nghiên cứu chứng minh có khả năng thúc đẩy quá trình tăng trưởng của chồi. Theo Mislal và cs (2020) [8], nước dừa có ảnh hưởng đến số chồi và lá của *Dendrobium* sp.. Việc sử dụng nước dừa tươi không phải lúc nào cũng thuận lợi vì phải phụ thuộc vào mùa vụ và khả năng bảo quản nước dừa tươi khi nhu cầu sử dụng nhiều. Vì vậy, nghiên cứu này thực hiện với các chất hữu cơ công nghiệp được đóng gói và có sẵn trên thị trường nhằm đảm bảo nguồn vật liệu ổn định và giá thành phù hợp như: NDH, BCT nguyên chất.

Nghiên cứu tiến hành thí nghiệm sử dụng vật liệu nước dừa đóng hộp Cocoxim (Việt Nam) hàm lượng từ: 0 ml/L, 50 ml/L, 75 ml/L 100 ml/L, 125 ml/L. Sau 6 tuần nuôi cấy kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng nhân nhanh và chất lượng chồi
(Sau 6 tuần nuôi cấy)

Công thức \ Chỉ tiêu	Hệ số nhân chồi (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Khối lượng cụm chồi (g)	Đường kính chồi (cm)	Đặc điểm chồi
CT1: Không bổ sung (ĐC)	3,5 ^b	2,0 ^b	0,65 ^c	0,32 ^c	Chồi xanh, nhỏ
CT2: 50 ml/l NDH	3,7 ^b	2,1 ^{ab}	0,77 ^{bc}	0,33 ^{bc}	Chồi xanh, nhỏ
CT3: 75 ml/l NDH	3,8 ^b	2,0 ^b	0,79 ^b	0,36 ^a	Chồi xanh, mập
CT4: 100 ml/l NDH	4,3 ^a	2,2 ^a	0,93 ^a	0,35 ^{ab}	Chồi xanh mập
CT5: 125 ml/l NDH	4,5 ^a	2,1 ^{ab}	0,85 ^{ab}	0,34 ^{ab}	Chồi xanh mập
CV%	4,5	3,8	2,3	3,7	
LSD _{0,05}	0,32	0,11	0,13	0,02	

Ghi chú: Môi trường nền 2,5 g/L hyponex + 0,5 mg/L BAP + 0,2 mg/L α -NAA + 30 g/L đường sucrose + 0,2 g/L THT + 15 mg/L chitosan + 6,5 g/L agar; trong cùng một cột số liệu, các giá trị mang cùng chữ cái là thể hiện sự sai khác không có ý nghĩa thống kê và ngược lại theo tiêu chuẩn LSD ở mức ý nghĩa $\alpha=0,05$

Sau 6 tuần nuôi cấy, các chồi lan Den 08.5.2 trên môi trường có bổ sung nước dừa đóng hộp hàm lượng khác nhau cho thấy, có sự khác biệt đáng kể so với đối chứng (0 ml/L nước dừa tươi). Hàm lượng nước dừa đóng hộp tăng lên thì chỉ tiêu hệ số nhân chồi cũng tăng từ 3,7 – 4,5 lần. Cao nhất ở công thức 4 và 5 với hệ số nhân chồi là 4,3 - 4,5 chồi. Chỉ tiêu chiều cao chồi dao động từ 2,0 - 2,2 cm. Cao nhất ở công thức 4 với chiều cao chồi 2,2 cm. Các chỉ tiêu theo dõi khối lượng cụm chồi và đường kính chồi cao nhất ở CT4 với khối lượng cụm chồi là 0,93 g/cụm, đường kính chồi 0,35 cm với đặc điểm hình thái chồi xanh mập. Khi tăng hàm lượng nước dừa đóng hộp lên 125 ml/L thì các chỉ tiêu theo dõi gần như không thay đổi và một số chỉ tiêu có xu hướng giảm như khối lượng cụm chồi là 0,85 g/cụm chồi, chiều cao chồi 2,1 cm, đường kính chồi là 0,34 cm.

Như vậy, trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* cây lan hoàng thảo có khả năng nhân chồi và chất lượng chồi tốt nhất ở hàm lượng nước dừa đóng hộp là 100 ml/L với các chỉ tiêu hệ số nhân chồi đạt 4,3 chồi, chiều cao chồi 2,2 cm, khối lượng cụm chồi 0,93 g, đường kính chồi 0,35 cm.

Bảng 4. Ảnh hưởng của bột chuối tiêu đến khả năng ra rễ và chất lượng cây non

(Kết quả sau 8 tuần nuôi cấy)

Công thức	Chỉ tiêu	Thời gian phát sinh rễ (ngày)	Số lá/cây (lá)	Chiều cao cây (cm)	Số rễ/cây (rễ)	Chiều dài rễ (cm)
CT1: Không bổ sung (ĐC)		19,2	3,22 ^b	4,90 ^c	4,50 ^c	3,27 ^c
CT2: 2,5 g/l BCT		19,0	3,27 ^b	5,30 ^b	5,20 ^b	3,43 ^b
CT3: 5 g/l BCT		19,3	3,32 ^b	5,66 ^a	5,17 ^b	4,10 ^a
CT4: 7,5 g/l BCT		18,2	3,56 ^a	5,75 ^a	5,38 ^a	4,17 ^a
CT5: 10 g/l BCT		18,4	3,50 ^a	5,70 ^a	5,23 ^{ab}	4,20 ^a
CV%			4,1	3,2	2,2	3,8
LSD _{0,05}			0,16	0,31	0,16	0,15

Ghi chú: Môi trường nền 2,5 g/L hyponex + 0,5 mg/L α -NAA + 0,3 g/L THT + 30 g/L đường sucrose + 6,5 g/L agar. Trong cùng một cột số liệu, các giá trị mang cùng chữ cái là thể hiện sự sai khác không có ý nghĩa thống kê và ngược lại theo tiêu chuẩn LSD ở mức ý nghĩa $\alpha=0,05$.

Bảng 4 cho thấy, bổ sung BCT vào môi trường thì các chỉ tiêu theo dõi đều thay đổi và cao hơn so với công thức đối chứng không bổ sung bột chuối. Chỉ tiêu thời gian ra rễ dao động từ 18,2 - 19,2 ngày. Thời gian ra rễ ít nhất ở CT4 và CT5. Ngoài ra chỉ tiêu số rễ/cây cũng tăng tỷ lệ thuận với hàm



Hình 1. Cụm chồi *in vitro* trên môi trường với hàm lượng nước dừa đóng hộp khác nhau

3.4. Ảnh hưởng của chuỗi tiêu đến khả năng ra rễ chất lượng cây giống

Để chất lượng cây con tối ưu và đạt mức tối đa thì trong quá trình nuôi cấy giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh cần tìm ra môi trường nuôi cấy phù hợp cho cây phát triển. Nghiên cứu tiến hành đánh giá ảnh hưởng của BCT đến khả năng ra rễ và chất lượng cây con trong giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh trước khi đưa ra vườn ươm. Thí nghiệm được tiến hành bởi 5 công thức khác nhau lần lượt là CT1: 0 g/L BCT (ĐC), CT2: 2,5 g/L BCT, CT3: 5 g/L BCT, CT4: 7,5 g/L BCT, CT5: 10 g/L BCT. Sau 8 tuần nuôi cấy, kết quả được thể hiện ở bảng 4.

lượng bột chuối. Cao nhất ở CT4 với số rễ/cây đạt 5,38 rễ. Tương tự, ở các chỉ tiêu chiều cao cây, số lá trên cây cũng cao nhất ở 2 công thức CT4, CT5. Cả 2 công thức CT4, CT5 đều thu được kết quả tương đương nhau khi quan sát hình thái đặc điểm cây đều mập, xanh đậm. Để quá trình sản xuất

công nghiệp hiệu quả thì công thức CT4 là công thức phù hợp.



Hình 2. Cây con môi trường ra rễ tạo cây hoàn chỉnh với hàm lượng BCT khác nhau

Bảng 5. Ảnh hưởng của một số giá thể sau ra ngôi đến tỷ lệ sống và khả năng sinh trưởng của cây con (Kết quả sau 6 tháng ra ngôi)

Chỉ tiêu Công thức	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây (lá)	Số rễ/cây (rễ)	Khối lượng cây (g)	Tỷ lệ xuất vườn (%)	Đặc điểm cây
CT1: Bột xơ dừa (ĐC)	98,8	6,73 ^b	6,25 ^b	9,55 ^b	1,42 ^b	88,88	Cây nhỏ, xanh đậm
CT2: Dón	98,8	7,82 ^a	6,72 ^a	10,66 ^a	1,51 ^a	91,11	Cây mập, xanh đậm
CT3: Vỏ thông	97,7	5,74 ^c	5,70 ^c	6,66 ^c	1,39 ^b	83,33	Cây nhỏ yếu, lá mềm
CV%		3,3	5,4	3,8	3,0		
LSD _{0,05}		0,59	0,44	0,65	0,06		

Ghi chú: Trong cùng một cột số liệu, các giá trị mang cùng chữ cái là thể hiện sự sai khác không có ý nghĩa thống kê và ngược lại theo tiêu chuẩn LSD ở mức ý nghĩa $\alpha=0,05$

Bảng 5 cho thấy, khi sử dụng 3 loại giá thể khác nhau thì tỷ lệ sống của cây con Den 08.5.2 khi ra ngôi đều rất cao đạt từ 97,7 - 98,8%. Các chỉ tiêu về chất lượng cây giống như chiều cao cây, số lá/cây, số rễ/cây, khối lượng cây đều cao nhất ở CT2 (dón) và thấp nhất ở CT3 (vỏ thông). Cây giống khi ra ngôi bằng dón cho kết quả tốt nhất với đặc điểm cây mập, có màu xanh đậm. Khi sử dụng vỏ thông để ra ngôi thì kết quả thu được là cây nhỏ, lá mềm. Vỏ thông là giá thể có độ thoáng

Như vậy, hàm lượng BCT phù hợp cho giai đoạn ra rễ tạo cây hoàn chỉnh là 7,5 g/L với các chỉ tiêu theo dõi số rễ/cây 5,38 rễ, chiều dài rễ là 4,17 cm, chiều cao cây 5,75 cm, số lá/cây là 3,56 lá.

3.5. Ảnh hưởng của một số giá thể sau ra ngôi đến tỷ lệ sống và khả năng sinh trưởng của cây con.

Giá thể là một trong những yếu tố quan trọng đối với cây trồng. Mỗi loại cây trồng hay giai đoạn trồng có yêu cầu khác nhau về giá thể. Để tìm được loại giá thể thích hợp nhất cho cây lan Den 08.5.2 trong giai đoạn ra ngôi đã tiến hành đánh giá ảnh hưởng một số loại giá thể như bột xơ dừa, dón, vỏ thông. Sau 6 tháng ra ngôi, kết quả được thể hiện ở bảng 5.

khí cao nhưng đồng thời khả năng giữ ẩm kém hơn so với giá thể dón và bột xơ dừa.

Chỉ tiêu số lá/cây biến động từ 5 - 8 lá. Trong đó, CT2 cho số lá trên cây cao nhất 6 - 8 lá, tiếp đến là CT1 đạt 6 - 7 lá, thấp nhất là CT3 với 5 - 6 lá.

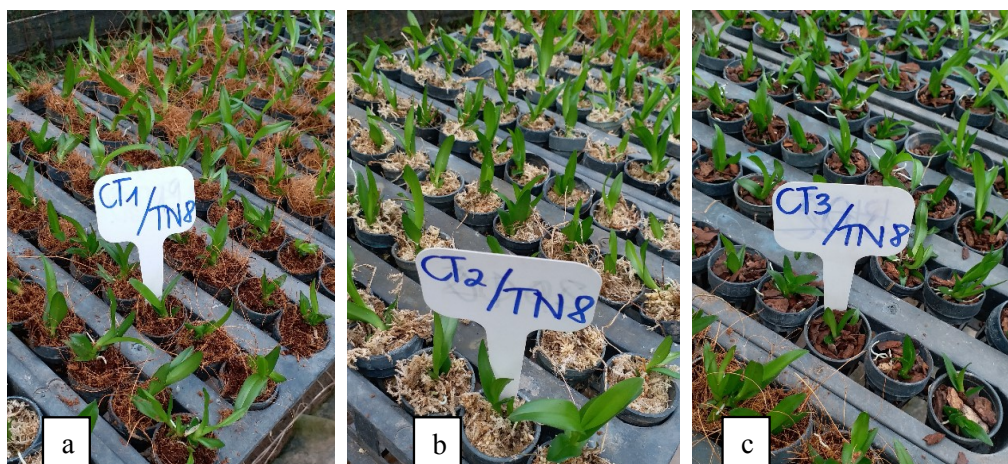
Chỉ tiêu số rễ trên cây có biến động nhiều từ 5 - 12 rễ. Trong đó, CT2 có số rễ nhiều nhất từ 9 - 12 rễ, ít nhất ở CT3 là 5 - 7 lá.

Tỷ lệ cây đạt tiêu chuẩn xuất vườn dao động từ 83,33 - 91,11%. Trong đó, CT2 (dón) đạt cao nhất

với 91,11%, tiếp đến là CT1 (xơ dừa) và thấp nhất là CT3 (vỏ thông) chỉ đạt 83,33%.

Như vậy, sử dụng giá thể 100% dớn cho giai đoạn ra ngôi lan Den 08.5.2 giúp tăng năng suất,

chất lượng cây giống với tỷ lệ cây đạt tiêu chuẩn xuất vườn là 91,11%, số lá/cây 6,72 lá, chiều cao cây đạt 7,82 cm, khối lượng cây đạt 1,51 g/cây.



Hình 3. Cây con ra ngôi trên các loại giá thể khác nhau: bột xơ dừa (a), dớn (b), vỏ thông (c)

4. KẾT LUẬN

Giai đoạn tạo vật liệu khởi đầu: Sử dụng nano bạc ở nồng độ 150 ppm, trong 45 phút cho hiệu quả khử trùng tốt nhất và cao hơn công thức đối chứng với tỉ lệ mẫu sạch là 78,89%, tỉ lệ mẫu sạch và sống đạt 72,22%, thời gian phát sinh hình thái là 17,3 ngày.

Giai đoạn nhân nhanh: Môi trường nhân nhanh tối ưu là 2,5 g/L hyponex + 0,5 mg/L BAP + 0,2 mg/L α -NAA + 0,2 g/L THT + 100 ml/L NDH + 15 mg/L chitosan với hệ số nhân đạt 4,3 chồi, chiều cao chồi 2,2 cm, khối lượng cụm chồi là 0,93 g/cụm, chồi xanh mập.

Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh: Môi trường tạo cây hoàn chỉnh thích hợp là hyponex 2,5 g/l + 0,5 mg/L α -NAA + 0,3 g/L THT + 7,5 g/L BCT với các chỉ tiêu theo dõi số rễ/cây 5,38 rễ, chiều dài rễ là 4,17 cm, chiều cao cây 5,75 cm, số lá trên cây là 3,56 lá.

Giai đoạn ra ngôi: Cây con lan hoàng thảo được ra ngôi trên nền giá thể dớn đạt hiệu quả tối ưu với tỷ lệ cây sống đạt 98,8% và chiều cao cây đạt 7,82 cm, khối lượng cây đạt 1,51 g/cây, tỷ lệ cây xuất vườn là 91,11%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hoàng Xuân Lam (2014). Nghiên cứu khả năng sinh trưởng, phát triển và biện pháp kỹ thuật

nhằm tăng năng suất, chất lượng giống hoa phong lan nhập nội (*Cattleya*, *Dendrobium*, *Oncidium*) cho miền Bắc Việt Nam. Luận án Tiến sĩ Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, Hà Nội, 18 - 21.

2. Tường Thị Lý, Đinh Thị Hồng Nhung, Phạm Xuân Tùng (2016). Kết quả khảo nghiệm giống hoa lan hoàng thảo Den 08.5.2. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, số 12(73), 10 - 16.

3. Sở Nông nghiệp và PTNT thành phố Hồ Chí Minh (2019). Một số thành tựu trong ứng dụng công nghệ cao lai tạo và sản xuất giống hoa lan tại thành phố Hồ Chí Minh. Kỷ yếu Hội thảo Ứng dụng công nghệ cao trong lai tạo và sản xuất giống hoa lan, ngày 26/4/2019.

4. Kharrazi M., Nemati H., Tehranifar A., Bagheri A. and Sharifi A. (2011). *In vitro* culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) focusing on the problem of vitrification. *J. Biol. Environ Sci*, vol. 13, 1 - 6.

5. Bùi Thị Thanh Phương, Nguyễn Phương Lan (2020). Ảnh hưởng của nano bạc đến khả năng nhân giống *in vitro* cây Trầu tiên (*Asarum glabrum* Merr.). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 62(6), 19 - 23.

6. Đồng Huy Giới, Ngô Thị Ánh (2017). Nghiên cứu sử dụng chế phẩm nano trong nuôi cấy mô cây mía (*Saccharum officinarum* L.). *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 6, 35 - 41.

7. Bùi Thị Thu Hương, Đồng Huy Giới (2019). Nghiên cứu sử dụng nano bạc trong nhân giống *in*

vitro Lan hồ điệp vàng (*Phalaenopsis* sp.). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, số 1, 19 - 24.

8. Mislal S. Harahap¹, Fauziyah Harahap, Syahmi Edi and Rosmayati (2020). *In vitro* Multification of *Dendrobium* sp. with Plant Growth Regulator. *IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series* 1485, 012041, 1 - 6.

A STUDY ON THE OPTIMIZATION OF TISSUE CULTURE PARAMETERS FOR THE MICROPROPAGATION OF DENDROBIUM SW. "DEN 08.5.2"

**Nguyen Van Tien¹, Nguyen Thi Hue¹, Duong Van Minh¹,
Nguyen Van Tinh¹, Dinh Thi Dinh¹**

¹*Center for Flowers, Ornamentals Research and Development,
Fruit and Vegetable Research Institute*

Summary

This study aimed to develop an efficient *in vitro* propagation protocol for the *Dendrobium* orchid "Den 08.5.2". Apical buds were effectively sterilized using a 150 ppm nano-silver solution for 45 minutes, resulting in a high rate of aseptic culture establishment (72.22%). Optimal shoot multiplication was achieved on a medium supplemented with 2.5 g/L Hyponex, 0.5 mg/L BAP, 0.2 mg/L α -NAA, 0.2 g/L activated charcoal (AC), 100 mL/L coconut juice and 15 mg/L chitosan. This medium yielded a multiplication rate of 4.3 shoots per explant, with an average shoot length of 2.2 cm and fresh weight of 0.93 g per shoot. Subsequent root development was optimized on a medium containing 2.5 g/L Hyponex, 0.5 mg/L α -NAA, 0.3 g/L AC and 7.5 g/L milled banana, resulting in 5.38 roots per plantlet, with an average root length of 4.17 cm, shoot length of 5.75 cm, and leaf number of 3.56 per plantlet. Finally, plantlets were successfully acclimatized to *ex vitro* conditions using Sphagnum moss as a substrate, demonstrating a high survival rate of 98.8% and achieving a plant height of 7.82 cm. This optimized protocol provides a foundation for the mass propagation of this valuable orchid cultivar

Keywords: *In vitro*, *Dendrobium*, *Den 08.5.2*, propagation.

Ngày nhận bài: 7/10/2024

Ngày gửi phản biện: 28/10/2024

Ngày thông qua phản biện: 8/11/2024

Ngày duyệt đăng: 14/11/2024