

NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY ĐỊA LAN KIẾM TIỀN VŨ

(*Cymbidium finlaysonianum* Lindl.)

Mai Quốc Quân¹, Dương Nguyễn Phương Dung¹, Đặng Thị Ngọc Hằng¹,
Hồ Nhật Được¹, Nguyễn Thị Huyền¹

Ngày nhận bài: 04/7/2022; Ngày phản biện thông qua: 18/8/2022; Ngày duyệt đăng: 19/8/2022

TÓM TẮT

Địa lan kiếm Tiên Vũ (*Cymbidium finlaysonianum* Lindl.) là một trong những loài địa lan được yêu thích hiện nay và được khai thác sưu tầm ngày càng nhiều bởi màu sắc, kiểu dáng, kích thước hoa và mùi thơm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện nhân giống *in vitro* cây Địa lan kiếm Tiên Vũ bằng phương pháp gieo hạt. Vật liệu cho nuôi cấy là hạt của quả lan 08 tháng tuổi. Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường MS cơ bản bổ sung vitamin Morel, đường 20 g/l, nước dừa 100 ml/l và agar 6,8 g/l là môi trường phù hợp để gieo hạt, hạt nảy mầm sau 32 ngày nuôi cấy. Kết quả khảo sát hàm lượng BA cho thấy khi môi trường MS bổ sung BA với nồng độ 3 mg/l, sucrose 30 g/l, agar 8 g/l, vitamin Morel và than hoạt tính 01 g/l đem lại hiệu quả nhân chồi tốt nhất, đạt 8,75 chồi/mẫu sau 45 ngày nuôi cấy, chiều cao chồi đạt 3,69 cm, chồi phát triển tốt. Môi trường tối ưu cho sự phát sinh rễ là MS bổ sung 2,0 mg/l NAA, 40 g/l sucrose, vitamin Morel, than hoạt tính 01 g/l và 8 g/l agar. Sau 45 ngày nuôi cấy, số rễ đạt 4,8 rễ/cây, chiều dài rễ đạt 10,42 cm, đường kính rễ đạt 1,92 mm, khối lượng tươi cây đạt 1,63 g. Kết quả của nghiên cứu đã góp phần tìm ra điều kiện phù hợp để nhân giống *in vitro* cây Địa lan kiếm Tiên Vũ.

Từ khóa: BA, Địa lan kiếm Tiên Vũ, NAA, nhân giống *in vitro*.

1. MỞ ĐẦU

Việt Nam là đất nước nằm trong khu vực nhiệt đới ẩm gió mùa, là khu vực có nhiều loài lan quý được thế giới biết đến bởi vẻ đẹp, sự phong phú và quý hiếm mang tính đặc hữu theo vùng miền. Cây Địa lan (*Cymbidium* sp.) là một trong những loài lan được yêu thích hiện nay và được khai thác sưu tầm ngày càng nhiều bởi màu sắc, kiểu dáng, kích thước hoa và mùi thơm. Trong đó, Địa lan kiếm Tiên Vũ (*Cymbidium finlaysonianum* Lindl.) là một trong những loài hoa được quan tâm hiện nay, cây có sự phân bố rộng từ Ba Vì, Quảng Trị, Quảng Nam - Đà Nẵng, Nha Trang, Bình Định, Tây Nguyên và phân bố ở Thái Lan, Malaysia, Indonexia, Philippin ... Cây có giả hành to lớn, lá to dài, hoa to và nhiều, màu sắc đẹp, cánh hoa dài và lâu tàn (Hợp, 1998).

Trong sản xuất cây giống, hoa lan được nhân giống chủ yếu theo các phương pháp như gieo hạt, tách nhánh ... tuy nhiên hiệu quả nhân giống thấp (Martin và Madassery, 2006). Trong tự nhiên, hạt lan rất khó nảy mầm vì không có nội nhũ (Hợp, 1998); nhân giống bằng phương pháp tách chiết lại thường rất chậm, hệ số nhân giống thấp và ảnh hưởng tới cây mẹ. Do đó việc ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* vào quá trình nhân giống cây lan là vấn đề cần được quan tâm và nghiên cứu.

Cho đến nay đã có nhiều nghiên cứu công bố trong và ngoài nước về nhân giống *in vitro* của chi *Cymbidium* được thực hiện. Nghiên cứu của các

tác giả như Dương Tấn Nhựt và cộng sự (Nhựt et al., 2006), Hoàng Thị Nga và cộng sự (Nga et al., 2008), Kha Nữ Tú Uyên (Uyên et al., 2014), Nguyễn Quang Thạch và cộng sự (Thạch et al., 2004), Phan Xuân Huyền và cộng sự (Huyền et al., 2004), Nguyễn Thị Điệp và Huỳnh Thị Kim (Điệp & Kim, 2020) các tác giả trên đã sử dụng chồi non của các cây *Cymbidium* sp. để thực hiện nhân giống; trong khi đó Chang et al. (2000) nhân giống thông qua rễ phát sinh từ mô sẹo; Chen et al. (2005) tái sinh cây từ hạt chưa trưởng thành. Tuy nhiên, vẫn chưa có nhiều nghiên cứu về nhân giống *in vitro* Địa lan kiếm Tiên Vũ từ phôi hạt.

Phương pháp nhân giống *in vitro* giúp gia tăng hệ số nhân giống, chủ động sản xuất một số lượng lớn cây giống có chất lượng cao, đồng đều và sạch bệnh ((Minh & Uyên, 2001), Minh & Uyên, 2001). Trong đó, việc cải tiến môi trường dinh dưỡng và sử dụng chất điều hòa sinh trưởng đóng vai trò quan trọng đối với sự sinh trưởng của cây. Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng các loại môi trường dinh dưỡng và chất điều hòa sinh trưởng ở các nồng độ khác nhau nhằm tìm ra điều kiện phù hợp nhất cho sự sinh trưởng và nhân nhanh cây Địa lan kiếm Tiên Vũ.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Khảo sát môi trường gieo hạt Địa lan kiếm

¹Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên;

Tác giả liên hệ: Mai Quốc Quân; ĐT: 0949683377; Email: mqquan@ttn.edu.vn.

Tiên Vũ thích hợp.

- Khảo sát ảnh hưởng của BA (6-Benzyladenin) đến sự tăng trưởng chồi Địa lan kiếm Tiên Vũ trong điều kiện *in vitro*.

- Khảo sát ảnh hưởng của NAA đến sự phát sinh rễ của chồi Địa lan kiếm Tiên Vũ trong điều kiện *in vitro*.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng, vật liệu, địa điểm nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: Địa lan kiếm Tiên Vũ.

- Vật liệu nghiên cứu:

+ Quả Địa lan kiếm Tiên Vũ 08 tháng tuổi.

+ Chồi lan kiếm Tiên Vũ *in vitro* từ hạt nảy mầm sau 03 tháng.

- Địa điểm nghiên cứu: Phòng Di truyền & Công nghệ tế bào Thực vật, Viện Công Nghệ Sinh học và Môi trường, trường Đại học Tây Nguyên.

2.2.2. Khảo sát môi trường gieo hạt

Quả lan sau khi được khử trùng, xẻ lấy hạt cấy vào các môi trường nền: MS (Murashige and Shooog, 1962); đa lượng $\frac{1}{2}$ MS, vi lượng MS; VW (Vacin and Went, 1949); Knudson C (Knudson, 1946); Bổ sung vào môi trường: vitamin Morel (1955), đường 20 g/l, nước dừa 100 ml/l, agar 6,8 g/l. Các môi trường được điều chỉnh pH ở mức 5,7 - 5,8 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút, áp suất 1 atm.

Các chỉ tiêu theo dõi khả năng nảy mầm của hạt: thời gian nảy mầm (ngày), đánh giá cảm quan phát sinh protocorm và màu sắc mầm.

2.2.3. Khảo sát nồng độ BA

Kế thừa kết quả nghiên cứu của thí nghiệm gieo hạt, chồi Địa lan kiếm Tiên Vũ được khảo sát sự tăng trưởng trong môi trường MS có bổ sung BA ở các nồng độ 0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/l. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên 01 yếu tố gồm 06 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức cấy 05 bình tam giác (V = 350 ml), mỗi bình cấy 10 mẫu cây. Thí nghiệm được lặp lại 03 lần.

Thành phần môi trường: Môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962), bổ sung đường sucrose 30 g/l, agar 8 g/l, vitamin Morel, BA từ 01 đến 05 mg/l và than hoạt tính 1 g/l. Mỗi bình chứa 100 ml môi trường. Môi trường được chỉnh pH = 5,8 trước khi hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm, trong 20 phút.

Cường độ ánh sáng 2.000 lux, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm tương đối $70 \pm 5\%$, thời gian nuôi cấy 45 ngày.

Chỉ tiêu theo dõi: Số chồi/mẫu, số lá/cụm chồi,

chiều cao chồi (cm), khối lượng tươi (g/mẫu), khối lượng khô (g/mẫu).

Chiều cao chồi được đo từ gốc đến chóp lá. Sau khi đo đếm các chỉ tiêu sinh trưởng mẫu chồi được đem sấy ở nhiệt độ 80°C đến khối lượng không đổi để xác định khối lượng khô.

2.2.4. Khảo sát nồng độ NAA

Khảo sát sự tăng trưởng và phát sinh rễ của chồi cây Địa lan kiếm Tiên Vũ khi được nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung NAA ở các nồng độ: 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3 mg/l.

Môi trường MS sử dụng trong thí nghiệm này cũng được bổ sung thêm đường, vitamin với hàm lượng tương tự thí nghiệm khảo sát nồng độ BA (mục 2.2.3).

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên 01 yếu tố gồm 07 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức cấy 05 bình tam giác (V = 350 ml), mỗi bình cấy 10 mẫu cây.

Chỉ tiêu theo dõi: Số lá/cây, số rễ/cây, chiều cao cây (cm), chiều dài rễ (cm), đường kính rễ chính (mm) (chọn 4 rễ lớn nhất để đo đường kính), khối lượng tươi (g/mẫu), khối lượng khô (g/mẫu).

2.2.5. Xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 03 lần. Số liệu được xử lý và phân tích bằng phần mềm SPSS 22.0 theo phương pháp Duncan Test với $P < 0,05$ (Duncan, 1955).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của môi trường gieo hạt đến khả năng nảy mầm của hạt

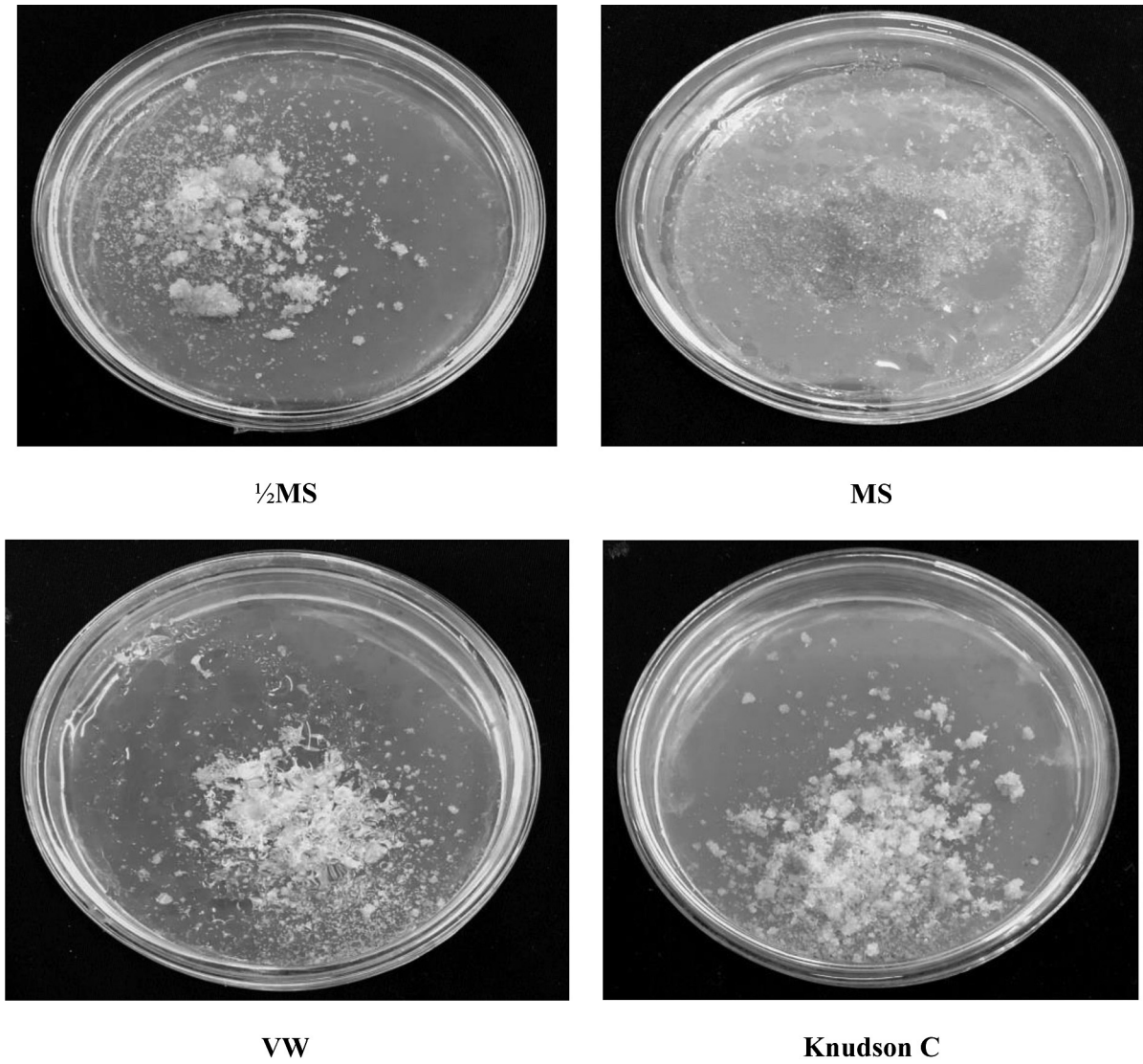
Nhiều công trình nghiên cứu trong nước và trên thế giới đã công bố kết quả nghiên cứu khử trùng mẫu quả của các giống lan (Millner *et al.*, 2008; Nga *et al.*, 2008). Kế thừa các kết quả đó chúng tôi tiến hành khử trùng quả Địa lan kiếm Tiên Vũ 8 tháng tuổi: khử trùng bằng xà phòng → rửa dưới vòi nước chảy → rửa sạch quả lan bằng cồn → lắc đều trong dung dịch Javel 15 phút (trong tủ cấy) → rửa lại 02 lần bằng nước cất vô trùng (trong tủ cấy) → gắp quả ra và xẻ lấy hạt cấy vào môi trường đã được chuẩn bị sẵn.

Quả lan sau khi được khử trùng, xẻ lấy hạt cấy vào các môi trường nền (MS, $\frac{1}{2}$ MS, VW, Knudson C). Hạt lan mới gieo vào môi trường rất mịn và có màu vàng nhạt. Sau khi nuôi cấy 60 ngày thu được kết quả ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả gieo hạt Địa lan kiểem Tiên Vũ

Môi trường gieo hạt	Khả năng nảy mầm của hạt		
	Thời gian nảy mầm (ngày)	Phát sinh Protocorm	Màu sắc mẫu
½MS	37	++	++
MS	32	+++	+++
VW	43	+	+
Knudson C	28	++	++

Ghi chú: +++: Chất lượng tốt, màu xanh đậm, ++: Chất lượng trung bình, màu xanh, +: Chất lượng kém, màu xanh nhạt.



Hình 1. Kết quả gieo hạt Địa lan kiểem Tiên Vũ trên 04 loại môi trường (MS, ½MS, VW và Knudson C)

Kết quả gieo hạt lan trên 04 loại môi trường (MS, ½MS, VW và Knudson C) cho thấy khoảng thời gian sau khi gieo hạt đến lúc hạt bắt đầu nảy mầm từ 28 đến 43 ngày. Trong đó, trên môi trường Knudson C hạt nảy mầm nhanh nhất chỉ sau 28 ngày, chậm nhất là trên môi trường VW sau 43 ngày. Tuy nhiên khả năng phát sinh Protocorm trên môi trường Knudson C kém hơn so với môi trường

MS. Về hình thái, chồi phát triển tốt nhất trên môi trường nền MS (đồng đều màu xanh bóng, không bị xốp, không bị mọng nước, chồi phát triển mạnh không bị biến dị), tiếp đến là môi trường ½MS và Knudson C, chồi trên môi trường VW phát triển kém.

Vì vậy, môi trường MS + vitamin Morel +

đường 20 g/l + nước dừa 100 ml/l + agar 6,8 g/l là thích hợp nhất cho sự nảy mầm của hạt Địa lan kiếm Tiên Vũ. Nghiên cứu của Touhidul Islam *et al.* (2015) cũng cho thấy môi trường MS là môi trường phù hợp cho sự nảy mầm của hạt địa lan *Cymbidium finlaysonianum* Lindl., hạt nảy mầm sau 40 ngày gieo. Nghiên cứu của Mahendran & Narmatha Bai (2012) cũng cho thấy quá trình tạo phôi soma của loài lan *Cymbidium bicolor* Lindl trên môi trường MS cơ bản cho tỷ lệ tạo phôi soma cao nhất, số phôi tạo thành/protocorm xấp xỉ 26.

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của BA đến sự tăng trưởng chồi *in vitro*

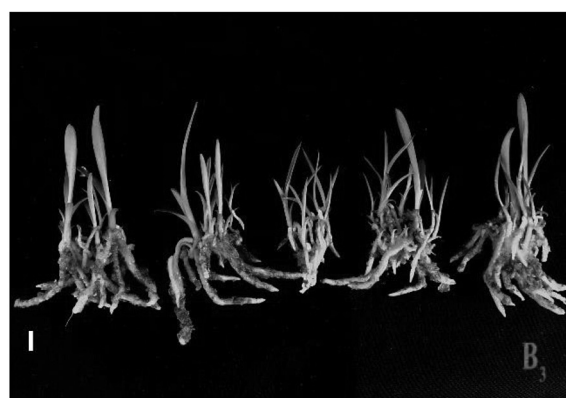
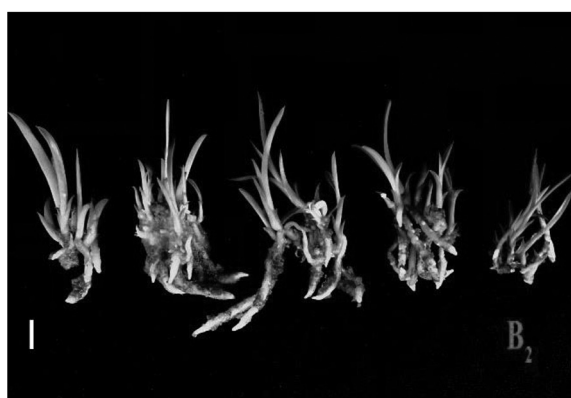
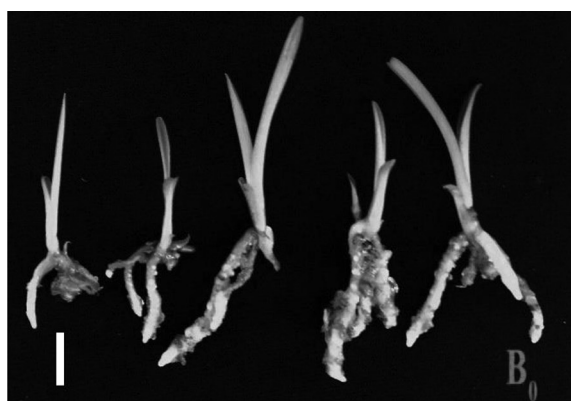
BA là một cytokinin được sử dụng nhiều trong

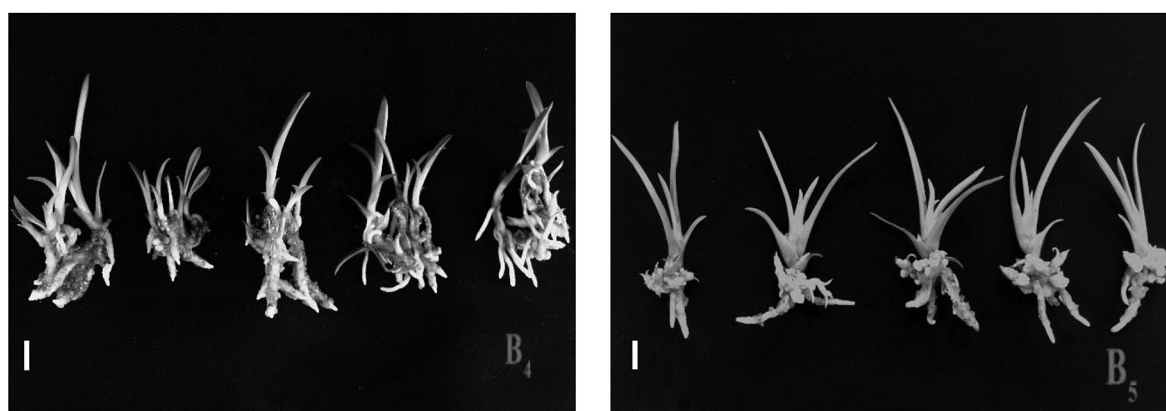
quá trình kích thích sự sinh trưởng chồi ở các loài thực vật nuôi cấy mô. Theo Chang & Chang (2003), cytokinin thúc đẩy mạnh quá trình phát sinh hình thái *in vitro* trong ống nghiệm của thực vật, tuy nhiên nhu cầu cytokinin khác nhau ở mỗi loài thực vật, thậm chí các loài khác nhau trong cùng một chi. Nghiên cứu của Shahinul Islam *et al.* (2015) trên loài *Cymbidium finlaysonianum* Lindl. cho thấy khi sử dụng BA ở các nồng độ 0,5, 1,0, 1,5 và 2 mg/l thì chồi có tốc độ tăng trưởng tốt nhất ở nồng độ 1,5 mg/l, chiều cao chồi tăng trung bình 3,28 cm sau 45 ngày. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng nồng độ BA từ 0 - 5 mg/l. Kết quả thí nghiệm sau 45 ngày theo dõi được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BA đến sự tăng trưởng chồi *in vitro* sau 45 ngày nuôi cấy

Nghiệm thức	Nồng độ BA (mg/l)	Số chồi/mẫu	Số lá/cụm chồi	Chiều cao (cm)	Khối lượng tươi (g/mẫu)	Khối lượng khô (g/mẫu)
B ₀	0,0	1,07 ^d ± 0,12	2,56 ^d ± 0,18	3,50 ^b ± 0,24	0,48 ^d ± 0,04	0,04 ^d ± 0,01
B ₁	1,0	5,25 ^c ± 0,29	2,58 ^d ± 0,20	2,30 ^d ± 0,16	0,96 ^c ± 0,09	0,09 ^{cd} ± 0,01
B ₂	2,0	8,12 ^b ± 0,14	2,78 ^{cd} ± 0,20	2,88 ^c ± 0,20	2,76 ^b ± 0,20	0,77 ^b ± 0,05
B ₃	3,0	8,75 ^a ± 0,32	3,94 ^a ± 0,27	3,69 ^b ± 0,26	6,13 ^a ± 0,44	1,18 ^a ± 0,04
B ₄	4,0	5,13 ^c ± 0,29	3,12 ^{bc} ± 0,22	2,82 ^c ± 0,20	2,42 ^b ± 0,17	0,78 ^b ± 0,04
B ₅	5,0	1,13 ^d ± 0,12	3,44 ^b ± 0,24	5,82 ^a ± 0,35	1,19 ^c ± 0,08	0,13 ^c ± 0,01

*Ghi chú: Các chữ cái a, b, c giống nhau trong cùng một cột thể hiện không có sự khác biệt về mặt thống kê theo trắc nghiệm Duncan với $P < 0,05$.





Hình 2. Ảnh hưởng của BA đến sự tăng trưởng chồi *in vitro* sau 45 ngày nuôi cấy

Ghi chú: B0 - 0 mg/l BA, B1 - 1 mg/l BA, B2 - 2 mg/l BA, B3 - 3 mg/l BA, B4 - 4 mg/l BA, B5 - 5 mg/l BA.

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của BA đến sự tăng trưởng chồi cho thấy ở các nồng độ BA khác nhau thì số lượng và kích thước chồi có sự khác biệt. Khi tăng nồng độ BA từ 1- 3 mg/l thì số chồi gia tăng nhanh từ 5,25 - 8,75 chồi/mẫu, khác biệt so với đối chứng không bổ sung BA chỉ đạt 1,07 chồi/mẫu. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ BA lên 4 - 5 mg/l số chồi giảm dần. Nghiên cứu của Posada *et al.* (1999) cũng cho thấy nồng độ BA từ 0,1 - 3 mg/l là nồng độ đáp ứng sự sinh trưởng của chồi tốt nhất trên một số loài thực vật.

Kết quả đánh giá chất lượng chồi cho thấy các chồi ở nghiệm thức được bổ sung BA nồng độ 3 mg/l sinh trưởng tốt, lá xanh dài, số lá/cụm chồi đạt 3,94; chiều cao chồi đạt 3,69 cm; chồi phát triển to khỏe nên khối lượng tươi và khô cao hơn so với các nghiệm thức còn lại; so với đối chứng không bổ sung BA khối lượng tươi của chồi cao gấp 12,77 lần, khối lượng khô cao gấp 29,5 lần. Nghiệm thức bổ sung BA nồng độ 5 mg/l có chiều cao chồi đạt cao nhất 5,82 cm tuy nhiên chất lượng chồi kém, thân mảnh, xanh nhạt.

Kết quả thí nghiệm cho thấy khi tăng nồng độ BA (1 – 3 mg/l) thì số chồi và chất lượng chồi tăng và đạt kết quả tốt nhất ở nồng độ 3 mg/l, tuy nhiên nếu nồng độ BA quá cao gây ức chế quá trình sinh trưởng của chồi. Nghiên cứu của Touhidul Islam *et al.* (2015) trên *Cymbidium finlaysonianum* Lindl.

sử dụng nồng độ thấp hơn so với nghiên cứu của chúng tôi, kết quả cho thấy trên môi trường MS với nồng độ BA 1,5 mg/l sự tăng trưởng chồi đạt kết quả cao nhất, khi tiếp tục tăng nồng độ BA lên 2,0 mg/l thì sự tăng trưởng chồi cũng giảm.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với các nghiên cứu của Bo *et al.* (2010) trên đối tượng lan Hải (*Paphiopedilum armeniacum*), nghiên cứu của Bijaya & Deepa (2012) trên đối tượng *Dendrobium primulinum* đều cho kết quả tăng trưởng chồi, khối lượng chồi và số rễ giảm dần khi tăng nồng độ BA lên quá cao. Nghiên cứu của Nguyễn Văn Tiến và cộng sự (Tiến *et al.*, 2020) trên cây lan kiếm Thanh Ngọc (*Cymbidium sinense*) cũng cho kết quả số chồi thu được cao nhất ở môi trường nuôi cấy bổ sung 3 mg/l BA, tuy nhiên chất lượng chồi đạt tốt nhất ở nồng độ BA là 2,5 mg/l.

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của NAA đến sự tạo rễ bất định *in vitro*

Auxin là chất điều hòa sinh trưởng có nhiều hiệu ứng sinh lý đối với thực vật, trong đó có hiệu ứng kích thích tạo rễ bất định, nên được sử dụng phổ biến trong giâm hom cũng như nuôi cấy mô tế bào thực vật (Khanh & Bằng, 2013). Trong nghiên cứu này, sự hình thành và phát triển của rễ dưới ảnh hưởng của NAA ở các nồng độ khác nhau được khảo sát, kết quả được ghi nhận sau 45 ngày nuôi cấy.

Bảng 3. Ảnh hưởng của NAA đến sự tạo rễ bất định *in vitro* sau 45 ngày nuôi cấy

Nghiệm thức	Nồng độ NAA (mg/l)	Số lá/cây	Chiều cao cây (cm)	Số rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)	Đường kính rễ chính (mm)	Khối lượng tươi (g/mẫu)	Khối lượng khô (g/mẫu)
ĐC	0	2,51 ^d ± 0,13	5,33 ^c ± 0,37	2,07 ^c ± 0,20	1,51 ^d ± 0,13	1,21 ^d ± 0,09	0,17 ^c ± 0,01	0,03 ^d ± 0,003
N0,5	0,5	3,01 ^c ± 0,21	6,26 ^{de} ± 0,44	3,65 ^{cd} ± 0,26	4,96 ^c ± 0,37	1,17 ^d ± 0,08	0,32 ^{de} ± 0,02	0,03 ^d ± 0,001

Nghiệm thức	Nồng độ NAA (mg/l)	Số lá/ cây	Chiều cao cây (cm)	Số rễ/ cây	Chiều dài rễ (cm)	Đường kính rễ chính (mm)	Khối lượng tươi (g/ mẫu)	Khối lượng khô (g/mẫu)
N1,0	1,0	3,41 ^{bc} ±	6,70 ^d ±	3,48 ^d ±	4,22 ^c ±	1,67 ^c ±	0,39 ^d ±	0,04 ^d ±
		0,23	0,49	0,25	0,32	0,12	0,03	0,004
N1,5	1,5	3,68 ^{ab} ±	10,6 ^b ±	4,13 ^b ±	9,75 ^a ±	1,79 ^{bc} ±	1,06 ^b ±	0,08 ^b ±
		0,26	0,76	0,30	0,68	0,12	0,08	0,008
N2,0	2,0	4,06 ^a ±	14,21 ^a ±	4,80 ^a ±	10,42 ^a ±	1,92 ^{ab} ±	1,63 ^a ±	0,11 ^a ±
		0,29	0,73	0,35	0,73	0,15	0,12	0,014
N2,5	2,5	4,07 ^a ±	8,21 ^c ±	4,00 ^{bc} ±	6,48 ^b ±	2,06 ^a ±	1,62 ^a ±	0,09 ^{ab} ±
		0,26	0,40	0,27	0,47	0,15	0,18	0,020
N3,0	3,0	3,34 ^{bc} ±	6,77 ^d ±	3,38 ^d ±	6,76 ^b ±	1,88 ^{abc} ±	0,71 ^c ±	0,06 ^c ±
		0,21	0,44	0,16	0,47	0,13	0,05	0,001

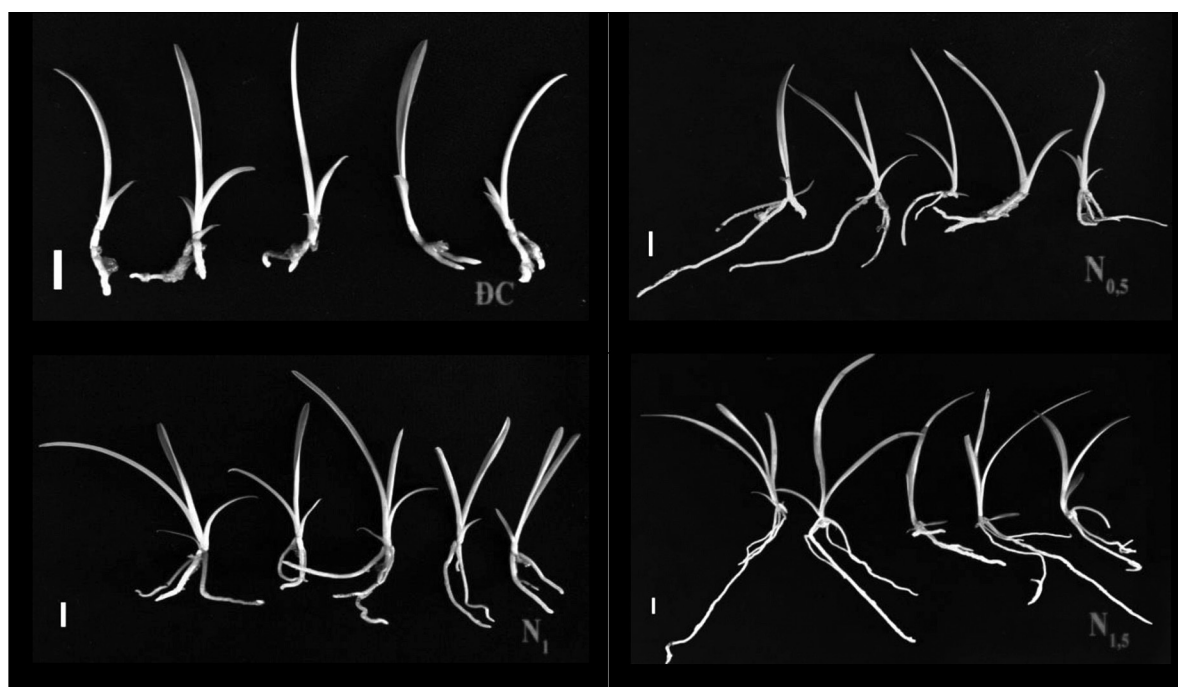
*Ghi chú: Các chữ cái a, b, c giống nhau trong cùng một cột thể hiện không có sự khác biệt về mặt thống kê theo trắc nghiệm Duncan với $P < 0,05$.

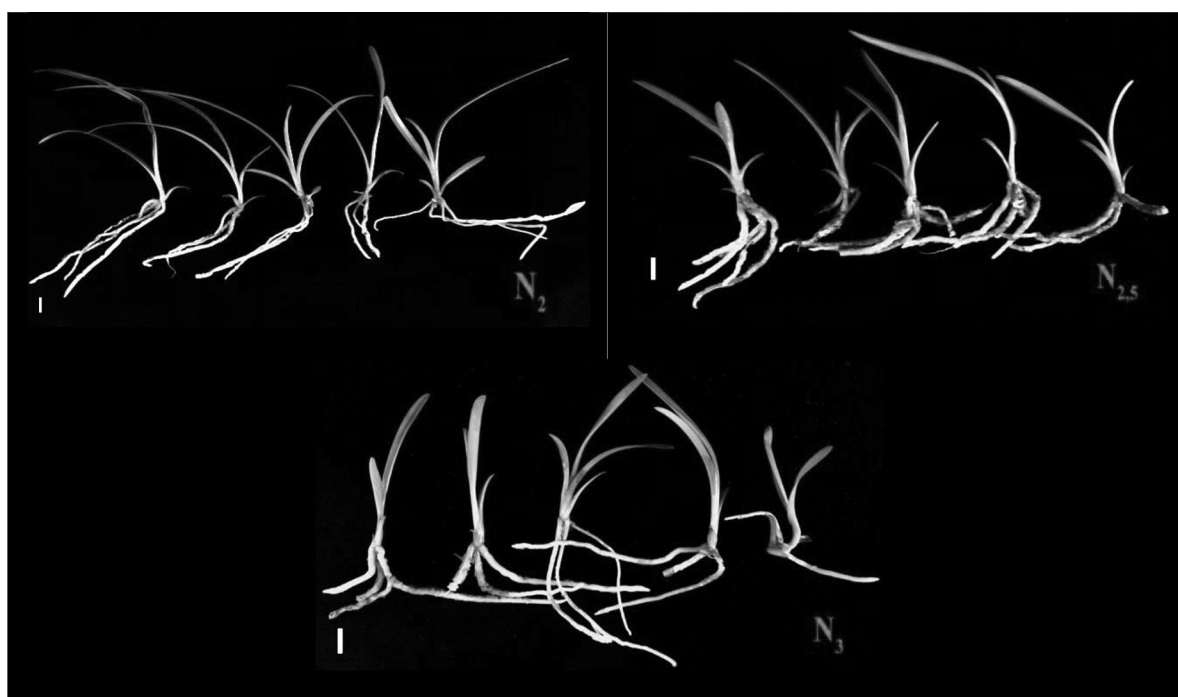
Kết quả nghiên cứu cho thấy khi tăng nồng độ NAA từ 0,5 - 2,0 mg/l thì số rễ, chiều dài rễ, đường kính rễ, khối lượng tươi và khối lượng khô tăng, chồi cây sinh trưởng tốt, số lá và chiều cao đều tăng. So với nghiệm thức đối chứng không bổ sung NAA, chồi cây ở nghiệm thức bổ sung NAA 2,0 mg/l có chiều cao tăng 2,67 lần, chiều dài rễ tăng 6,9 lần, số rễ tăng 2,3 lần.

Số lá/cây đạt giá trị cao ở nghiệm thức bổ sung NAA nồng độ 2,0 - 2,5 mg/l. Đường kính rễ tăng ở các nghiệm thức được bổ sung NAA ở nồng độ từ 1,0 - 3,0 mg/l, đạt kích thước từ 1,88 - 2,06 mm ở nồng độ NAA 2,0 - 3,0 mg/l. Tuy nhiên ở nồng độ NAA 3,0 mg/l chồi phát triển kém hơn so với nồng độ 2,0 - 2,5 mg/l; số rễ, số lá, đường kính rễ,

chiều cao và chiều dài rễ đều thấp hơn do đó khối lượng cây thấp hơn so với cây được nuôi cấy ở môi trường có nồng độ NAA 2,0 - 2,5 mg/l. Như vậy, bổ sung nồng độ NAA cao có thể gây ức chế sinh trưởng.

Cây ở nghiệm thức được bổ sung NAA nồng độ 2,0 mg/l có độ đồng đều cao, lá xanh dài, thân mập hơn so với các nghiệm thức còn lại do đó khối lượng tươi và khối lượng khô đạt giá trị cao, khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng. Cụ thể, cây có khối lượng tươi cao gấp 9,6 lần đối chứng, khối lượng khô cao gấp 3,7 lần đối chứng. Do đó, chúng tôi lựa chọn nồng độ NAA là 2,0 mg/l bổ sung vào môi trường MS để tăng khả năng hình thành rễ của chồi Địa lan kiếm Tiên Vũ trong điều kiện *in vitro*.





Hình 3. Ảnh hưởng của NAA đến sự tạo rễ bất định *in vitro* sau 45 ngày nuôi cấy (thanh đứng 01 cm)

Nghiên cứu của Shahinul Islam *et al.* (2015) nhân nuôi *Cymbidium finlaysonianum* Lindl. trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung NAA ở các nồng độ 0,5, 1,0, 1,5 và 2,0 mg/l thì sự phát sinh rễ đạt kết quả tốt nhất ở nồng độ NAA 1,0 mg/l, chiều dài rễ tăng trung bình 3,2 cm sau 45 ngày nuôi cấy, tuy nhiên khi tăng nồng độ NAA lên 2,0 g/l thì chiều rễ chỉ tăng 2,75 cm sau 45 ngày nuôi cấy. Trong nghiên cứu của chúng tôi, chiều dài rễ đạt tới 9,75 – 10,42 cm (tương ứng với nồng độ NAA 1,5 – 2,0 g/l) sau 45 ngày.

Kết quả nghiên cứu của Lê Thị Luận và cộng sự (Luận *et al.*, 2020) trên đối tượng là cây lan Giả hạc Hawaii (*Dendrobium adastra*) cũng cho thấy chồi *in vitro* tạo rễ tốt nhất trên môi trường MS cơ bản có bổ sung 1,5 mg/l NAA, đạt số rễ 9,42 rễ/chồi, chiều dài rễ đạt 1,83 cm sau 06 tuần nuôi

cây; khi tiếp tục tăng nồng độ NAA lên 2,0 mg/l thì số rễ và chiều dài rễ đều giảm, khi tăng đến nồng độ 3,0 mg/l thì sự hình thành rễ kém hơn cả đối chứng.

4. KẾT LUẬN

Môi trường MS + vitamin Morel + đường 20 g/l + nước dừa 100 ml/l + agar 6,8 g/l là môi trường thích hợp nhất cho sự nảy mầm của hạt Địa lan kiếm Tiên vũ, thời gian nảy mầm là 32 ngày kể từ lúc gieo hạt.

Môi trường MS + sucrose 30 g/l + agar 8 g/l + vitamin Morel + than hoạt tính 1 g/l bổ sung BA 3 mg/l thích hợp nhất cho nhân chồi, đạt 8,75 chồi/mẫu sau 45 ngày nuôi cấy. Chồi *in vitro* tạo rễ tốt nhất trên môi trường MS cơ bản có bổ sung 2,0 mg/l NAA, số rễ đạt 4,8 rễ/cây và chiều dài rễ trung bình đạt 10,42 cm sau 45 ngày nuôi cấy.

IN VITRO PROPAGATION OF *Cymbidium finlaysonianum* Lindl. ORCHID

Mai Quoc Quan², Duong Nguyen Phuong Dung², Dang Thi Ngoc Hang²,
Ho Nhat Duoc², Nguyen Thi Huyen²

Received Date: 04/7/2022; Revised Date: 18/8/2022; Accepted for Publication: 19/8/2022

SUMMARY

Cymbidium finlaysonianum is one of the current favorite orchid lines and is exploited and collected by the number of species, colors, designs, flower sizes and fragrances. In this study, we carried out *in vitro* propagation of *C. finlaysonianum* by seeding culture. Explant specimens for culture are seeds of an 8-month-old wild orchid. The results showed that the seeds germinated the best when inoculated on MS medium supplemented with vitamin Morel, sugar 20 g/l, coconut water 100 ml/l and agar 6.8 g/l, seeds germinated after 32 days of culture. The results of the survey on BA content showed that when adding BA at a concentration of 3 mg/l to MS medium + sucrose 30 g/l + agar 8 g/l + vitamin Morel + activated carbon 1 g/l, it was effective the best shoot multiplication, reaching 8.75 buds/sample after 45 days of culture, shoot height reached 3.69 cm, buds developed well. The optimal medium for rooting was MS medium supplemented with 2.0 mg/l NAA, 40 g/l sucrose, vitamin Morel, activated carbon 1 g/l and 8 g/l agar. After 45 days of culture, the number of roots reached 4.8 roots per shoot, the average root length was 10.42 cm, the root diameter was 1.92 mm, and the plant weight was 1.63 g. The study results have contributed to finding the right conditions for the propagation of *Cymbidium finlaysonianum*.

Keywords: BA, *Cymbidium finlaysonianum*, *in vitro* propagation, NAA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bijaya, P. & Deepa, T. (2012). In vitro mass propagation of an epiphytic orchid, *Dendrobium primulinum* Lindl through shoot tip culture. *African Journal of Biotechnology*, 11(42): 9970-9974.
- Bo, L., Alex, X.N., Zhi-ying, C. & Chun-lin, L. (2010). *In vitro* propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 101(2):151-162.
- Chang, C. & Chang, W. (2000). Micropropagation of *Cymbidium ensifolium* var. *Misericors* through callus-derived rhizomes. *In vitro cellular and developmental biology – plant*, 36(6): 517-520.
- Chang, C. & Chang, W.C. (2003). Cytokinins promotion of flowering in *Cymbidium ensifolium* var. *misericors in vitro*. *Plant Growth Regulation*, 39(3): 217 – 221.
- Chen Y., Liu X. & Liu Y. (2005). In vitro plant regeneration from the immature seeds of *Cymbidium faberi*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 81(2): 247-251.
- Duncan, D. B. (1955). Multiple Range and Multiple F-Tests. *Biometrics*, 11: 1-42.
- Điệp, N.T. & Kim, H.T. (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.
- Helen J. Millner, Abraham Obeng, Alison R. McCrea & Timothy C. Baldwin (2008). Axenic seed germination and *in vitro* seedling development of *Restrepia brachypus* (Orchidaceae). *Journal of the Torrey Botanical Society*, 135(4): 497-505.
- Hợp, T. (1998). Phong lan Việt Nam. NXB Nông nghiệp.
- Huyền, P.X., Ái, N.T., Lang, N.T., Hương, N.T.D., Khiêm, Đ.V. & Nhật, D.T. (2004). Phục tráng và nhân nhanh các giống địa lan (*Cymbidium* spp.) bằng nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. *Tạp chí Sinh học*, 26(1): 48-54.
- Khanh, N.N., & Bằng, C.P. (2013). Sinh lý học thực vật. NXB Giáo dục, Hà Nội.
- Knudson, L. (1946). A new nutrient solution for germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*, 15: 214-217.
- Luận, L.T., Quyên, N.T.T., Thúy, L.T.N., Tuấn, N.Đ., Phương, N.H. & Phụng, T.T.B. (2020). Nghiên

²Institute of Biotechnology and Environment, Tay Nguyen University;
Corresponding author: Mai Quoc Quan; Tel: 0949683377; Email: mqquan@ttn.edu.vn.

- cứu nhân giống *in vitro* cây lan Giả hạc Hawaii (*Dendrobium adastra*). Báo cáo khoa học hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc 2020, nhà xuất bản Đại Học Huế, tr 897-902.
- Mahendran G. & Narmatha Bai V (2012). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from seed derived protocorms of *Cymbidium bicolor* Lindl. *Scientia Horticulturae*, 135: 40 - 44.
- Martin K. P., Madassery J. (2006). Rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium hybrids* through direct shoot formation from foliar explants and protocorm like bodies. *Scientia Horticulturae*, 108: 95-99.
- Minh, T.V. & Uyển, N.V. (2001). Vi nhân giống phong lan nhóm *Dendrobium* trên quy mô công nghiệp, nhân giống *in vitro*. Tạp chí Khoa học Công nghệ, 1: 1- 9
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiology*, 15: 473-497.
- Nga, H.T., Thạch, N.Q., Thịnh, Đ.Đ. & Tú, H.M. (2008). Xây dựng quy trình nhân nhanh giống địa lan Hồng hoàng (*Cymbidium iridioides*) bằng kỹ thuật nuôi cấy mô. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp*, 4: 387-394.
- Nhật, D.T., Lan, N.H.N., Tường, T.N., Luận, V.Q., Vinh, B.V.T. & Huyền, P.X. (2006). Ảnh hưởng của hệ thống nuôi cấy lên sự hình thành thể tròn tương tự chồi non (protocorm-like body) và nghiên cứu rút ngắn thời gian sinh trưởng của cây hoa địa lan *Cymbidium* sp. nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 4(3): 353-362.
- Posada M, Ballesteros N, Obando W, Angarita A (1999). Micropropagation of Gerbera from floral buds. *Acta Horticulturae*, 482: 329-332.
- Shahinul Islam S. M., Touhidul Islam, Bakul Bhattacharjee, Tushar Kanti Mondal, Sreeramanan Subramaniam, (2015). *In vitro* pseudobulb based micropropagation for mass development of *Cymbidium finlaysonianum* Lindl. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 27(6): 469-474.
- Thạch, N.Q., Nga, H.T., Anh, N.T.L. & Muội, L.T. (2004). Nghiên cứu nhân nhanh *in vitro* giống địa lan thương mại miss Kim. *Tạp chí Nông nghiệp - Nông thôn - Môi trường*, 11: 1503-1505.
- Tiến, N.V., Đông, Đ.V., Mỹ, C.T.N., Tinh, N.V. & Minh, D.V. (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*, 09(118): 88-93.
- Touhidul Islam, Bakul Bhattacharjee, S.M. Shahinul Islam, Jasim Uddain and Sreeramanan Subramaniam (2015). Axenic seed culture and *in vitro* mass propagation of malyasian wild orchid *Cymbidium finlaysonianum* Lindl. *Pakistan Journal of Botany*, 47(6): 2361-2367.
- Uyên, K.N.T., Dũng, P.Đ., Tú, N.T.H., Loan, V.T.H. & Điệp, N.T. (2014). Nghiên cứu xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* Địa lan hương Cát Cát (*Cymbidium golden elf*). *Tạp chí Khoa học Đại học Sư Phạm thành phố HCM*, 64: 86-93.
- Vacin, Emil F. & F. W. Went (1949). Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gazette*, 110(4): 605-613.