

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG NHÂN GIỐNG LOÀI LAN HOÀNG THẢO SÁP (*DENDROBIUM CREPIDATUM* LINDL. & PAXT.) IN VITRO

NGUYỄN VĂN KẾT, NGUYỄN VĂN VINH

1. GIỚI THIỆU

Ở Việt Nam, *Dendrobium* có đến 100 loài, xếp trong 14 tông, được phân biệt bằng thân (giả hành), lá và hoa [2]. Nhiều loài lan rừng Việt Nam đặc biệt là các loài thuộc chi *Dendrobium* cho hoa đẹp, màu khảm, tạo nên một tổ hợp và màu sắc rất phong phú; hoa có hương thơm, lâu tàn, chùm hoa nở kéo dài từ 1 – 2 tháng mới hết hoa nên rất được khách hàng ưa chuộng và với tình trạng thu hái, buôn bán lan rừng trái phép phổ biến như hiện nay sẽ dẫn đến nguy cơ làm mất nguồn gen lan rừng trong một tương lai gần. Việc nghiên cứu nhân giống cây lan cây lan hoàng thảo sấp (*Dendrobium crepidatum* Lindl.& Paxt.) sẽ góp phần vào công việc bảo tồn các nguồn gen lan rừng của Việt Nam. Cho đến nay, đã có nhiều nghiên cứu vi nhân giống cây *Dendrobium* đã được báo cáo [3, 4, 9, 12, 14, 18, 23, 24]. Tuy nhiên, đến nay vẫn chưa có nghiên cứu cụ thể về việc nhân giống *in vitro* loài lan giả hạc này. Nghiên cứu này nhằm mục đích xác định loại môi trường khoáng, các chất điều tiết sinh trưởng cũng như chất bổ sung phù hợp nhất cho quá trình nhân nhanh cây lan hoàng thảo sấp nhằm góp phần vào công tác bảo tồn loài lan rừng Việt Nam cũng như hướng tới việc nhân nhanh cây con phục vụ thương mại hóa loài hoa đẹp và có giá trị thẩm mỹ cao này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu



Hình 1. Cây phong lan hoàng thảo sấp (*Dendrobium crepidatum* Lindl.& Paxt.)

Thí nghiệm được tiến hành trên cây lan hoàng thảo sấp (*Dendrobium crepidatum* Lindl. & Paxt.) phân bố tại rừng Nam Cát Tiên thuộc tỉnh Lâm Đồng (hình 1). Mẫu cây là các chồi 0,5 cm - 0,6 cm tách từ các cây con gieo *in vitro*.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chồi 0,5 cm - 0,6 cm cây lan hoàng thảo sấp được sử dụng để khảo sát ảnh hưởng của nồng độ khoáng lên sự sinh trưởng của cây. Thí nghiệm được khảo nghiệm trên 4 loại môi trường:

- Môi trường MS, Murashige và Skoog (1962) + 8 g/l agar + 0,5 g/l than hoạt tính.
- ½ khoáng MS + 8 g/l agar + 0,5 g/l than hoạt tính, pH 5,8.
- VW (Vacin Went, 1949) + 2 g peptone + 8 g/l agar + 0,5 g/l than hoạt tính, pH 5,2.
- Hyp (Hyponex, Kano, 1965) loại 20N-20P-20K 1 g/l + 1 g/l loại 6,5N-4,5P-19K) + 2 g peptone + 8 g/l agar + 0,5 g/l than hoạt tính, pH 5,6.

BA (6-benzyl-amino purine) có nồng độ lần lượt là 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 và 3,0 mg/l hoặc TDZ (1-phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)-urea) có nồng độ lần lượt là 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 và 3,0 mg/l được bổ sung vào môi trường khoáng Vacin Went + 2 g peptone + 8 g/l agar + 0,5 g/l than hoạt tính.

2.3. Điều kiện thí nghiệm

Các thí nghiệm được thực hiện tại phòng Công nghệ sinh học thực vật (Khoa Nông Lâm Đại học Đà Lạt) trong điều kiện nhiệt độ phòng ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$, độ ẩm 80 – 85%, thời gian chiếu sáng 10 h/ngày, cường độ chiếu sáng $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$).

Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, mỗi nghiệm thức cây trong 5 bình polycarbonate (thể tích 370 ml) có chứa 70 ml môi trường, mỗi bình được cấy 9 mẫu. Số liệu được đo đếm vào ngày thứ 90 sau khi nuôi cấy ở tất cả các thí nghiệm. Số liệu thu được được xử lý thống kê bằng phần mềm MstatC.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng môi trường khoáng trong nhân giống *in vitro* lan hoàng thảo sấp

Kết quả ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến chiều cao cây, số lá, số rễ, số chồi của cây lan *Dendrobium crepidatum* *in vitro* vào ngày thứ 90 trình bày trong bảng 1. Trong 4 loại môi trường thí nghiệm, môi trường Vacin Went cho kết quả về các chỉ tiêu sinh trưởng về chiều cao của cây (2,8 cm); số rễ (5,0) và chiều dài rễ (2,3 cm) cao hơn một cách có ý nghĩa so với các môi trường khác.

Kết quả vào ngày 90 sau khi nuôi cấy, ở môi trường Vacin Went cây phát triển tương đối đồng đều, cây mập, khỏe, hệ rễ phát triển mạnh. Trên môi trường MS và Hyponex sự sinh trưởng và tái sinh chồi có phần chậm hơn so với môi trường Vacin Went nhưng sau 90 ngày nuôi cấy vẫn cho kết quả về sinh trưởng chiều cao cây con vẫn tốt hơn nhiều so với môi trường ½ MS.

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến chiều cao cây, số lá, số rễ, số chồi của cây lan *Dendrobium crepidatum* in vitro vào ngày thứ 90

Môi trường	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá/cây)	Số chồi (chồi/cây)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)
MS	2,10 b	8,7 a	3,1 b	2,2 b	1,61 c
½ MS	1,60 c	7,5 a	2,2 b	2,4 b	1,87 b
Vacin Went	2,80 a	8,8 a	5,2 a	5,0 a	2,30 a
Hyponex	1,98 bc	8,8 a	2,6 b	3,4 b	1,9 b
CV %	15,48	25,85	33,18	34,17	8,12
LSD	0,3997	2,657	1,322	1,350	0,1923
ANOVA	**	**	**	**	**

Ghi chú: ** :Khác biệt ở mức có ý nghĩa $p \leq 0,01$;

- Các chữ cái khác nhau theo các giá trị trung bình biểu hiện sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng Duncan
- CV: Coefficient of variation (hệ số biến thiên); LSD: sự lệch nhau có ý nghĩa nhỏ nhất.

Thành phần môi trường nuôi cấy ảnh hưởng không đáng kể đến sự số lá của cây, chỉ tiêu về số lá trung bình trên cây hầu như không có khác nhau ở trên cả 4 loại môi trường khảo sát, số lá trung bình nằm trong khoảng 7,5 – 8,8. Alam và cộng sự (2002) cũng thu nhận kết quả tương tự khi nghiên cứu về ảnh hưởng của môi trường MS và Hyponex đến sự sinh trưởng của cây lan *Dendrobium transparens* thì chỉ tiêu về số lá của cây con sau 6 tuần nuôi cấy cũng không có sự khác biệt.

Ngoài chiều cao thì chỉ tiêu về số chồi thường rất được quan tâm trong việc nhân nhanh cây con nuôi cấy *in vitro*, trong thí nghiệm này số chồi tái sinh đạt cao nhất trên môi trường Vacin Went (5,2 chồi), sự tái sinh chồi ở ba môi trường còn lại không có sự khác biệt có ý nghĩa.

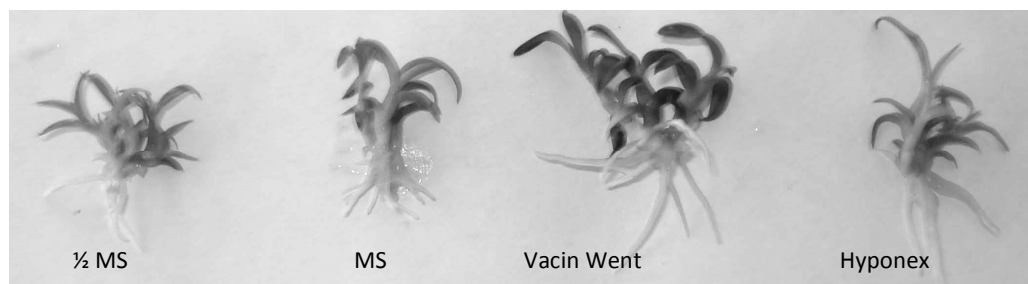
Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến trọng lượng tươi, trọng lượng khô, tỉ lệ chất khô của cây lan hoàng thảo sấp in vitro vào ngày thứ 90 sau trên môi trường nuôi cấy

Môi trường	Trọng lượng tươi (mg/cây)	Trọng lượng khô (mg/cây)	Tỉ lệ chất khô (%)
MS	148,9 c	11,75 c	7,86 b
½ MS	130,7 d	9,610 d	7,34 c
Vacin Went	255,4 a	21,54 a	8,43 a
Hyponex	180,5 b	14,33 b	7,93 b
CV %	7,48	8,96	4,13
LSD	16,27	1,559	0,39
ANOVA	**	**	**

Ghi chú: ** :Khác biệt ở mức có ý nghĩa $p \leq 0,01$

- Các chữ cái khác nhau theo các giá trị trung bình biểu hiện sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng Duncan
- CV: Coefficient of variation (hệ số biến thiên); LSD: sự lệch nhau có ý nghĩa nhỏ nhất.

Kết quả bảng 2 cho thấy có sự khác biệt rõ rệt về trọng lượng tươi của cây trên 4 loại môi trường nuôi cấy. Trên môi trường Vacin Went, cây lan *Dendrobium* sinh trưởng và phát triển tốt, đạt trọng lượng tươi cao (255,4 mg) sau đó là đến môi trường Hyponex (180,5 mg), thấp nhất là môi trường ½ MS (130,7 mg). Trọng lượng khô cũng cho kết quả cao trên môi trường Vacin Went (21,5 mg) và thấp nhất thấp nhất là môi trường ½ MS (9,6 mg).



Hình 2. Ảnh hưởng của thành phần môi trường đến sự sinh trưởng của cây lan hoàng thảo sấp sau 90 ngày trên môi trường nuôi cấy

3.2. Ảnh hưởng của nhóm cytokinin lên khả năng tạo cụm chồi của cây hoàng thảo sấp

Bảng 3. Ảnh hưởng của TDZ và BA lên số chồi, trọng lượng tươi, trọng lượng khô, tỉ lệ chất khô của cây lan hoàng thảo sấp

Nghiệm thức (mg/l)	Số chồi (chồi/cụm chồi)	Trọng lượng tươi (mg/cây)	Trọng lượng khô (mg/cây)	Tỉ lệ chất khô (%)
ĐC (0.0)	3.1 c	273,5 c	21,99 d	8,03 c
0,5 TDZ	5,2 b	365,4 b	31,26 b	8,56 a
1,0 TDZ	4,3 b	252,5 e	21,10 d	8,35 b
1,5 TDZ	3,3 c	238,4 e	19,13 e	8,02 c
2,0 TDZ	1,9 d	236,4 e	18,34 e	7,75 d
3,0 TDZ	1,9 d	145,1 f	11,27 g	7,77 d
0,5 BA	6,8 a	426,7 a	36,85 a	8,63 a
1,0 BA	4,5 b	369,9 b	30,78 b	8,32 b
1,5 BA	4,4 b	324,0 c	27,19 c	8,39 b
2,0 BA	3,0 c	236,9 e	19,05 e	8,04 c
3,0 BA	1,8 d	162,0 f	13,04 f	8,05 c
CV %	22,1	6,31	6,31	1,59
LSD	0,94	20,43	1,68	0,15
ANOVA	**	**	**	**

Ghi chú: ** :Khác biệt ở mức có ý nghĩa $p \leq 0,01$;

- Các chữ cái khác nhau theo các giá trị trung bình biểu hiện sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng Duncan;

- CV: Coefficient of variation (hệ số biến thiên); - LSD: sự lệch nhau có ý nghĩa nhỏ nhất.

BA và TDZ thường được sử dụng để kích thích sự phân hóa, sinh trưởng và phát triển chồi của mẫu cây *in vitro*. Tác dụng chủ yếu BA và TDZ là kích thích sự phân chia mạnh mẽ của tế bào, đặc biệt ảnh hưởng rõ rệt lên sự hình thành và phân hoá chồi [7, 16]. Trong nghiên cứu này, trên môi trường khoáng Vacin Went với các nồng độ BA và TDZ lần lượt là 0,0, 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 và 3,0 mg/l cho thấy có sự khác biệt rõ rệt giữa các nghiệm thức bổ sung TDZ và các nghiệm thức bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau sau 90 ngày nuôi cấy. Khả năng kích thích tạo chồi ở cây lan hoàng thảo sấp thì TDZ tỏ ra kém hiệu quả hơn BA.

Trên môi trường đối chứng không bổ sung TDZ hoặc BA, chồi phát triển theo hướng tạo cây hoàn chỉnh có rễ với chiều cao vượt trội, số chồi ở mức trung bình (3,1 chồi/ cụm chồi). Trong khi đó, môi trường có bổ sung TDZ (0,5 - 1,0 mg/l) hoặc BA (0,5 - 1,5 mg/l) đã kích thích sự hình thành các chồi bất định làm gia tăng số lượng chồi tạo thành cụm chồi cao hơn đối chứng một cách có ý nghĩa. Với TDZ (0,5 mg/l) bổ sung vào môi trường cho kết quả cao nhất (5,2 chồi/cụm chồi). Với BA (0,5 mg/l) bổ sung vào môi trường cho kết quả cao nhất (6,8 chồi/cụm chồi). Nhìn tổng quát tác động của TDZ và BA đối với mức độ cảm ứng tạo chồi ở trong thí nghiệm này thì rõ ràng BA cho hiệu quả cao hơn TDZ một cách rõ rệt.

Ở các nghiệm thức có nồng độ BA và TDZ cao hơn 2,0 mg/l đều có tác dụng làm giảm số lượng chồi hình thành và xuất hiện sự tăng sinh bất thường, kết quả này cũng đã được [7, 8, 13, 22] báo cáo.

Trong thí nghiệm này, trọng lượng tươi cũng như trọng lượng khô của cây đạt kết quả cao nhất ở nghiệm thức có bổ sung 0,5 mg/l BA (426,7 mg và 36,8 mg tương ứng), sau đó là ở nồng độ 1 mg/l BA (369,9 mg và 30,8 mg tương ứng) và 0,5 mg/l TDZ (365,4 mg và 31,2 mg tương ứng). Các nghiệm thức có nồng độ chất điều tiết sinh trưởng càng cao thì kết quả càng làm giảm trọng lượng tươi cũng như trọng lượng khô cuối cùng,

4. KẾT LUẬN

Trong kết quả của thí nghiệm này có thể rút ra một số kết luận sau:

Kết quả nghiên cứu bước đầu cho thấy trong 4 loại môi trường thí nghiệm, môi trường Vacin Went cho kết quả về các chỉ tiêu sinh trưởng về chiều cao của cây cao hơn một cách có ý nghĩa so với các môi trường khác.

Trên môi trường Vacin Went, cây lan *Dendrobium* sinh trưởng và phát triển tốt, đạt trọng lượng tươi cao (255,4 mg) sau đó là đến môi trường Hyponex (180,5 mg), thấp nhất là môi trường ½ MS (130,7 mg). Trọng lượng khô cũng cho kết quả cao trên môi trường Vacin Went (21,5 mg).

Tác động BA cảm ứng tạo chồi ở trong thí nghiệm này cho hiệu quả cao hơn TDZ một cách rõ rệt. Với BA (0,5 mg/l) bổ sung vào môi trường cho kết quả cao nhất (6,8 chồi/cụm chồi).

Nồng độ chất điều tiết sinh trưởng càng cao thì kết quả càng làm giảm trọng lượng tươi cũng như trọng lượng khô cuối cùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Văn Chi, Dương Đức Tiến - Phân loại thực vật bậc cao, Nhà xuất bản Đại học và Trung học chuyên nghiệp Hà Nội, 1987.
2. Nguyễn Công Nghiệp - Trồng hoa lan, Nhà xuất bản Trẻ, 2000.

3. Alam M. K, M. H. Rashid, M. S. Hossain, M. A. Salam and M. A. Rouf - *In vitro* Seed Propagation of Dendrobium (*Dendrobium transparens*) Orchid as Influenced by Different Media. *Biotechnology* **1** (2-4) (2002) 111-115.
4. Arditti J. - *Fundamentals of Orchid Biology*, John Wiley & Sons, Canada, 1992.
5. Gamborg O. L., T. Murashige, T. A. Thorpe, and I. K. Vasil - Plant tissue culture media, *In Vitro* **12** (1976) 473-478.
6. Geogre E. F. and P. D. Sherrinngton - In: *Plant Propagation by Tissue Exegetics* Ld., everslley, England, 1984, pp. 324-366.
7. Huetteman C. A. and J. E. Preece - Thidiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **33** (1993) 05-119.
8. Ket N. V., E. J. Hahn, S. Y. Park, D. Chakrabarty, and K. Y. Paek - Micropropagation of an Endangered Orchid *Anoectochilus formosanus*, *Biologia Plantarum* **48** (3) (2003) 339-344.
9. Khatun H., M. M. Khatun M. S. Biswas M. R. Kabir and M. Al-Amin - *In vitro* Growth and Development of *Dendrobium* hybrid orchid, *Bangladesh J. Agril. Res.* **35** (3) (2010) 507-514.
10. Lou H. and S. Kako - Role of high sugar concentration in inducing somatic embryogenesis from cucumber cotyledons, *Scientia Hort* **64** (1995) 11-20.
11. Madhuri S. et al. - Micropropagation of *Dendrobium joannie* Ostenhault, *Journal of the Orchid Society of India* **4** (1990) 145-148.
12. Martin K. P. and Joseph Madassery - Rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm-like bodies, *Scientia Horticulturæ* **108** (1) (2006) 95-99.
13. Meyer H. J. and J. V. Staden - *In vitro* multiplication of *Ixia flexuosa*, *HortScience*, **25** (1988) 1070-1071.
14. Mridass M., R. Mahesh, G. Raju, A. Benniamin, and K. Muthuchelian - *In vitro* Propagation of *Dendrobium nanum* through rhizome bud culture, *International Journal of Biological Technology* **1** (2) (2010) 50-54.
15. Murashige T. - Plant propagation through tissue cultures, *Annu. Rev. Plant Physiol*, **25** (1974) 135-166.
16. Murashige T. - Plant growth substances in commercial uses of tissue culture, In: Skoog F. (Ed.), *Plant Growth Substances*, Berlin – Springer – Verlag, 1980, pp. 426-434.
17. Nakano M., Y. Niimi D. Kobayashi, and Watanabe - Adventitious shoot regeneration and micropropagation of hybrid tuberous begonia (*Begonia tuberhybrida* Voss), *Scientia Hort*, **79** (1999) 245-251.
18. Nayak N. R., S. P. Rath, and S. N. Patnaik - *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobidium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobidium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron-induced high frequency proliferation. *Scientia Hort*. **71** (1997b) 243-250.
19. Paek K. Y., E. J. Hahn, and S. H. Son - Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of platns, *In Vitro Cell Deve. Biol.* **37** (2001) 149-157.

20. Park S. Y., H. N. Murthy, and K. Y. Paek - Mass multiplication of protocorm-like bodies (PLBs) using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **63** (2000) 67-72.
21. Pierik R. L. M. - *In vitro* culture of higher plants, Martinus NiJhoff Pulisher, Dordrecht. The Netherlands, 1987.
22. Preece J. E. and M. R. Imel - Plant regeneration from leaf explants of *Rhododendron* P. J. M. hybrids. *Scientia Hort.* **48** (1991) 159-170.
23. Ramsundar V., Beena K. P., Rajan S., Ramprasad C. - *In vitro* micropropagation of *Dendrobium* × *Sonia*, *South Indian Horticulture* **48** (1/6) (2000) 149-153.
24. Ricardo T. de Faria, Faiana N. Rodrigues. Luciana do V. R. Oliveira. Cláudio Müller - *In vitro Dendrobium nobil* Plant growth and rooting in different sucrose concentrations, *Horticultura Brasileira* **22** (4) (2004) 780-783.

SUMMARY

IN VITRO PROPAGATION OF THE HOANG THAO SAP (*DENDROBIUM CREPIDATUM* LINDL. & PAXT.)- A VALUE ORCHID VARIETY

It is outlined for four experiments on invitro propagation of *Dendrobium crepidatum* Lindl.& Paxt. The treatment with Vacin Went medium reached the highest results, plant height (2.8 cm), numbers of roots (5.0), root length (2.3 cm), and numbers of multiple shoot formation (5.2). In addition, *Dendrobium crepidatum* in Vacin Went media gave the best fresh yield (255.4 mg), lower Hyponex (180.5 mg), and lowest ½ MS (130.7 mg). Dry weight of plants from Vacin Went media also showed the highest result (21.5 mg). BA containing media indicated remarkable effects in shoot formation to TDZ.. BA supplemented media (0.5 mg/l) attained the highest increase 6.8 shoots/shoot clumps, fresh weight 426.7 mg, and dry weight 36.8 mg. It can be said that the higher concentration of plant growth regulator is, the lower the final fresh and dry weight are.

Địa chỉ:

Nguyễn Văn Kết.

Khoa Nông Lâm, Đại học Đà Lạt,

Nguyễn Văn Vinh,

Đại học Công nghiệp TP. Hồ Chí Minh

Nhận bài ngày 10 tháng 5 năm 2010