

NHÂN GIỐNG *IN VITRO* LOÀI HOA LAN QUÝ HIẾM HUYẾT NHUNG TRƠN (*RENANTHERA IMSCHOOTIANA* ROLFE)

IN VITRO PROPAGATION OF A PRECIOUS ORCHID SPECIES *RENANTHERA IMSCHOOTIANA* ROLFE

Trần Quang Dân^{1,2}, Nguyễn Minh Lý¹, Võ Châu Tuấn¹

¹Trường Đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng; minhlyvn24@gmail.com, vouchautuan@gmail.com

²Đại học Kagawa, Nhật Bản; tqdan@ued.udn.vn

Tóm tắt - Huyết nhung trơn (*Renanthera imschootiana* Rolfe) là một loài hoa phong lan nhiệt đới quý hiếm. Trong bài báo, nhóm tác giả đã khảo sát ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng (ĐHST) đến khả năng nhân nhanh *in vitro* loài hoa này. Hạt nảy mầm ưu thế trên môi trường MS (Murashige – Skoog, 1962) sau 45 ngày. Protocorm nhân nhanh tốt nhất trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L KIN (Kinetin), 0,5 mg/L NAA (axít α -naphthaleneacetic), 15% CW (nước dừa), và 1,0 g/L AC (than hoạt tính). Chồi được nhân nhanh từ protocorm nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L KIN và 15% CW với hệ số nhân chồi đạt 15,33 chồi/mẫu cấy sau 12 tuần. Sự sinh trưởng của chồi tốt nhất với chiều cao đạt 1,07 cm sau 8 tuần trên môi trường MS bổ sung 2,0 mg/L BA (6-benzylaminopurine), 0,25 mg/L NAA, và 15% CW. Môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L NAA là thích hợp để tạo rễ với 2,4 rễ/chồi sau 8 tuần. Cây con trồng ở giá thể dớn + than (1:1) thích nghi tốt ở điều kiện vườn ươm với tỷ lệ sống sót 91,6%.

Từ khóa - huyết nhung trơn; nuôi cấy mô tế bào; nhân giống *in vitro*; tái sinh cây con; protocorm; nảy mầm không cộng sinh.

1. Đặt vấn đề

Huyết nhung trơn (*Renanthera imschootiana* Rolfe), hay còn gọi là lan Phượng Vĩ, là một loài phong lan quý hiếm, có xuất xứ tự nhiên từ một số khu rừng nguyên sinh đặc trưng với độ cao 1.000 – 1.500 m thuộc tỉnh Quảng Châu - Trung Quốc, Ấn Độ, Myanmar, và Việt Nam [2, 11]. Huyết nhung trơn thuộc nhóm lan đơn thân, phát hoa phân cành với 20 - 30 hoa, hoa có màu đỏ, đốm vàng ở cánh hoa, thời gian nở hoa kéo dài hơn 3 tuần [2, 14]. Huyết nhung trơn được Hiệp hội Thương mại Động - Thực vật hoang dã CITES (2013) (theo Wikipedia, CITES là viết tắt của “Công ước về thương mại quốc tế các loài động, thực vật hoang dã nguy cấp”) liệt vào danh mục thực vật bị đe dọa và có nguy cơ tuyệt chủng, vì những lo ngại trước sự khai thác quá mức loài lan này từ tự nhiên. Với cấu trúc hoa độc đáo, đẹp, lâu tàn, và thích nghi được với nhiệt độ 20 - 32°C, Huyết nhung trơn đã được sử dụng cho mục đích trang trí dưới dạng hoa chậu hoặc hoa cắt cành, và cũng được xem như là một loài hoa có giá trị kinh tế. Ngoài ra, loài lan này cũng được sử dụng làm cây bố mẹ để lai tạo các loài lan lai cùng chi [15]. Ở Việt Nam, Huyết nhung trơn chỉ phân bố tự nhiên ở một số vùng núi khu vực Tây Bắc Bộ, Nam Trung Bộ, và cũng đang ở trong tình trạng cần được bảo tồn [6, 13].

Nuôi cấy mô tế bào thực vật được xem là công cụ hữu hiệu trong việc nhân giống và góp phần bảo tồn *in vitro* nhiều loài hoa lan quý hiếm [1]. Seeni và cộng sự [11] lần đầu tiên đề cập về sự cảm ứng chồi trực tiếp từ cuống lá

Abstract - *Renanthera imschootiana* Rolfe, an extremely precious and horticultural valuable tropical epiphytic orchid, needs to be conducted *in vitro* propagation. In this study, we investigate the effect of phytohormones on rapid *in vitro* propagation of this orchid species. Seed germination is favorable in basal medium MS (Murashige – Skoog, 1962) for 45 days after sowing. Protocorm proliferation is the best in the MS medium supplemented with 1.0 mg/L KIN (Kinetin), 0.5 mg/L NAA (α -naphthaleneacetic acid), 15% CW (coconut water). The MS medium added with 1.5 mg/L KIN and 15% CW is suitable for shoot multiplication from protocorm, with average number of the regenerated shoots per explant up to 15.33 after 12 weeks. The growth of the shoots is the best in the MS medium combined with 2.0 mg/L BA (6-benzylaminopurine), 0.25 mg/L NAA, and 15% CW, with average height of the shoots reaching 1.0 cm during 8 weeks. The highest rate of rooting from the shoots, on average 2.4 roots per shoot, is obtained in the MS medium fortified with 1.0 mg/L NAA after 8 weeks. The plantlets are transplanted to substrate mixture of sphagnum moss and peat with ratio of 1:1 adapted to natural greenhouse condition with survival rate of 91.6%.

Key words - *Renanthera imschootiana* Rolfe; plant tissue culture; rapid *in vitro* propagation; plantlet transplantation; protocorm; asymbiotic germination.

non (34 -38 chồi/mẫu lá) sau 20 tuần cấy chuyển liên tục trên môi trường Mitra có bổ sung kết hợp BA và NAA. Cây con tái sinh không có sự biến đổi hình thái và số lượng nhiễm sắc thể [11]. Với nguồn mẫu ban đầu là hạt, Wu và cộng sự [15] đã thiết lập điều kiện nảy mầm không cộng sinh *in vitro*, nhân nhanh protocorm với hệ số nhân 2,88 protocorm/protocorm, và tái sinh cây con từ protocorm đạt tỷ lệ khá cao (95,67%). Cây con tái sinh đã cho thấy sự thích nghi ở cả điều kiện vườn ươm và môi trường sống tự nhiên của nó [15]. Nhìn chung, các nghiên cứu này đã bước đầu thiết lập được các điều kiện tái sinh *in vitro* và nhân nhanh protocorm; tuy nhiên, với hệ số nhân còn hạn chế (2,88 protocorm/protocorm) và môi trường nuôi cấy sử dụng nhiều chất hữu cơ bổ sung [15], thời gian nuôi cấy kéo dài [11], nên làm hạn chế tính hiệu quả của việc ứng dụng các kết quả thu được vào sản xuất thực tế. Bên cạnh đó, điều kiện nhân nhanh chồi từ protocorm vẫn chưa được khảo sát, một bước rất quan trọng để nâng cao hiệu quả nhân giống [1]. Ngoài ra, ở Việt Nam cho đến nay vẫn chưa có một công trình nghiên cứu nào công bố liên quan đến việc nhân giống *in vitro* loài cây này.

Dựa vào các kết quả nghiên cứu đã trình bày ở trên, trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã tiến hành khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tái sinh protocorm, chồi, và rễ để hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* loài lan Huyết nhung trơn một cách có hiệu quả và có tiềm năng ứng dụng sản xuất thực tiễn, góp phần bảo tồn nguồn gen quý hiếm này ở điều kiện Việt Nam.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Khử trùng mẫu vật và nảy mầm hạt

Quả lan sau khi thụ phấn 5 tháng đã được thu từ các cây lan Huyết nhung tron bố mẹ (cây bố mẹ được thu thập từ Vườn Quốc gia Kon Ka Kinh, tỉnh Gia Lai). Quả được rửa sạch dưới vòi nước chảy và khử trùng bề mặt quả theo phương pháp đã được mô tả bởi Wu và cộng sự [15]. Hạt được tách ra và gieo trên môi trường cơ bản MS có bổ sung 0,5 - 2,0 mg/L BA + 1,0 g/L AC. Thời gian bắt đầu nảy mầm (ngày) được xác định dựa vào sự hình thành cấu trúc protocorm [15]; tỷ lệ hạt nảy mầm và đặc điểm sinh trưởng protocorm được đánh giá sau 8 tuần nuôi cấy. Khoảng 500 – 1.000 hạt được gieo trong 1 bình nuôi cấy và lặp lại với 03 bình.

2.2. Nhân nhanh protocorm

Protocorm 8 tuần tuổi sau khi nảy mầm được cấy chuyển qua môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L KIN kết hợp với 0,25 - 1,0 mg/L NAA + 1,0 g/L AC. Ngoài ra, 15% (v/v) CW sau khi lọc bằng giấy lọc cũng được bổ sung vào các môi trường nuôi cấy để khảo sát ảnh hưởng tăng cường của nước dừa đến khả năng nhân nhanh protocorm. Khả năng nhân nhanh protocorm sau 8 tuần nuôi cấy được đánh giá thông qua tỷ lệ mẫu cấy phát sinh protocorm mới (%), khả năng nhân nhanh, và đặc điểm sinh trưởng của protocorm.

2.3. Tái sinh và sinh trưởng chồi (nhân nhanh chồi)

Protocorm sau khi nhân nhanh được tách thành từng khối có đường kính khoảng 5 mm và cấy chuyển trên môi trường MS + 15% CW và bổ sung 0,5 - 2,0 mg/L KIN riêng lẻ hoặc kết hợp với 0,3 mg/L NAA. Khả năng nhân nhanh và sinh trưởng chồi từ protocorm được đánh giá thông qua số chồi/mẫu protocorm, tỷ lệ protocorm tái sinh chồi (%), và đặc điểm sinh trưởng của chồi sau 12 tuần nuôi cấy.

Các chồi phát sinh từ protocorm có chiều cao khoảng 0,3 cm được nuôi cấy trên các môi trường MS + 15% CW và bổ sung 1,0 - 2,0 mg/L BA kết hợp với 0,25 - 1,0 mg/L NAA. Khả năng sinh trưởng của chồi được đánh giá sau 8 tuần nuôi cấy thông qua số lá/chồi, chiều cao chồi (cm), đặc điểm sinh trưởng của chồi.

2.4. Tạo rễ

Các chồi có chiều cao khoảng 1,0 cm với 2 - 3 lá được cấy lên môi trường MS + 1,0 g/L AC và bổ sung 0,25 - 1,0 mg/L NAA để khảo sát khả năng tạo rễ và phát triển cây hoàn chỉnh. Thời gian xuất hiện rễ, tỷ lệ chồi phát sinh rễ (%), số rễ/chồi, chiều dài rễ (cm) được quan sát sau 8 tuần nuôi cấy.

2.5. Huấn luyện cây con

Cây con tái sinh hoàn chỉnh có chiều cao khoảng 1,0 cm với 2 - 3 rễ được duy trì trong các bình nuôi cấy ở điều kiện ánh sáng và nhiệt độ phòng trong khoảng 10 ngày. Sau đó, cây được chuyển ra khỏi bình nuôi cấy, rửa sạch môi trường và trồng trên 3 loại giá thể: dớn, than + dớn (tỷ lệ 1:1), và than + dớn + xơ dừa (tỷ lệ 1:1:1) trong điều kiện vườn ươm có nhiệt độ trung bình 28±3°C, độ ẩm 80-90%, và ánh sáng tự nhiên. Khả năng thích nghi của cây con được đánh giá thông qua tỷ lệ sống sót và tình trạng của cây sau 2 tuần.

2.6. Điều kiện nuôi cấy in vitro và bố trí thí nghiệm

Toàn bộ các công thức môi trường nuôi cấy được chuẩn bị với 30 g/L sucrose, 8 g/L agar, và điều chỉnh pH = 5,8 trước khi hấp khử trùng ở điều kiện 121°C, áp suất 1,0 atm,

15 phút. Mỗi bình nuôi cấy (thể tích 500 ml) chứa 90 ml môi trường và 5 mẫu (protocorm hoặc chồi). Mẫu nuôi được duy trì trong điều kiện phòng nuôi với nhiệt độ 25°C, cường độ chiếu sáng 2.000 lux, thời gian chiếu sáng 12 h/ngày. Các thí nghiệm được thiết kế ngẫu nhiên, mỗi công thức thí nghiệm được thực hiện với 2 bình nuôi cấy và lặp lại 03 lần. Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm thống kê SAS ver.11 với các thuật toán ANOVA và Duncan's test.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của BA đến khả năng nảy mầm của hạt

Các bộ phận khác nhau, như chồi đỉnh, lá, phát hoa, hạt,... thường được sử dụng làm vật liệu nuôi cấy ban đầu trong các nghiên cứu nuôi cấy mô tế bào hoa lan [5]. Ngoài sự tái sinh tự nhiên, khả năng nảy mầm của hạt thường được tăng cường bởi các môi trường nuôi cấy có chứa các chất dinh dưỡng và ĐHST khác nhau [7]. Ví dụ, Hossain và cộng sự [7] đã thu được sự nảy mầm với tỷ lệ 100% khi gieo hạt lan *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl trên môi trường Mitra có bổ sung 1,0 mg/L BA. Wu và cộng sự [15] đã công bố tỉ lệ nảy mầm tốt nhất của hạt lan Huyết nhung đạt 93,1% trên môi trường cơ bản ¼MS có chứa 0,5 mg/L NAA + 1,0 g/l pepton + 20% CW + 1,0 g/L AC. Trong thí nghiệm này, nhóm tác giả đã sử dụng môi trường MS có bổ sung 0,5 - 2,0 mg/L BA để khảo sát ảnh hưởng của nó đến khả năng nảy mầm của hạt. Kết quả thu được ở Bảng 1 cho thấy, khả năng nảy mầm hạt tốt hơn trên môi trường cơ bản MS không bổ sung BA, thời gian nảy mầm sau 45 ngày với các protocorm có màu xanh đậm, to khỏe (Bảng 1, Hình 1A). Sự nảy mầm càng bị hạn chế khi tăng dần nồng độ BA với các protocorm có màu xanh nhạt, sức sống yếu sau 8 tuần nuôi cấy.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA đến khả năng nảy mầm của hạt sau 8 tuần gieo hạt

BA (mg/L)	Thời gian nảy mầm (ngày)	Tỷ lệ hạt nảy mầm*	Đặc điểm hình thái của protocorm
-	45	+++	Protocorm to, màu xanh đậm
0,5	50	++	Protocorm nhỏ, màu xanh nhạt
1,0	57	+	Protocorm nhỏ, sinh trưởng yếu
2,0	65	+	Protocorm nhỏ, sinh trưởng yếu

* Tỷ lệ nảy mầm của hạt được ước lượng và thể hiện qua các kí hiệu: +++: cao, ++: khá; +: trung bình.

Trong điều kiện khó xác định chính xác tỷ lệ phần trăm hạt nảy mầm do kích thước hạt rất bé; tuy nhiên, theo ước lượng của nhóm tác giả, tỷ lệ nảy mầm của hạt đạt khoảng 90% trên môi trường MS, khác biệt không đáng kể so với kết quả đã được báo cáo bởi Wu và cộng sự [15]. Tuy nhiên, quan sát hình thái cho thấy hạt có xu hướng hình thành các protocorm hơn là chồi trên các môi trường đã khảo sát sau 8 tuần (Hình 1A). Điều này cho thấy sự bổ sung BA riêng lẻ là không thích hợp cho sự phát triển tiếp theo của chồi sau giai đoạn phát sinh protocorm từ hạt.

3.2. Ảnh hưởng của KIN, NAA, và CW đến khả năng nhân nhanh protocorm

Các protocorm sau khi xuất hiện từ sự nảy mầm của hạt

có thể tiếp tục duy trì và nhân nhanh trên môi trường nuôi cấy thích hợp. Việc xác định môi trường nuôi cấy tối ưu để nhân nhanh các protocorm sẽ làm tăng hiệu quả của quy trình nhân giống [1, 14]. Wu và cộng sự [15] đã khảo sát khả năng nhân nhanh của protocorm trên môi trường bổ sung NAA kết hợp BA và sự kết hợp 0,5 mg/L NAA + 1,5 mg/L BA + 20% CW + 1,0 g/L pepton đã cho hiệu quả nhân protocorm tốt nhất với hệ số nhân đạt 2,88 sau 8 tuần. Ngoài BA, KIN cũng thường được sử dụng để cảm ứng sự tái sinh và nhân nhanh protocorm ở nhiều loài lan [4].

Bảng 2. Ảnh hưởng của chất KIN, NAA, and CW đến khả năng nhân protocorm sau 8 tuần

CW (%)	KIN (mg/L)	NAA (mg/L)	Tỷ lệ mẫu phát sinh protocorm (%)	Khả năng nhân nhanh*
-	-	-	26,67	+
-	1,0	0,25	35,55	+
-	1,0	0,50	64,45	+++
-	1,0	0,75	44,44	++
-	1,0	1,00	35,54	++
15	1,0	0,25	46,41	++
15	1,0	0,50	91,10	++++
15	1,0	0,75	84,45	+++
15	1,0	1,00	82,22	++

*Khả năng nhân nhanh protocorm được ước lượng và thể hiện qua các kí hiệu: +++++: cao, ++++: khá; ++: trung bình; +: yếu

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã khảo sát ảnh hưởng kết hợp của 1,0 mg/L KIN và 0,25 - 1,0 mg/L NAA lên khả năng nhân nhanh protocorm của cây lan Huyết nhung tron (Bảng 2). Kết quả cho thấy, môi trường MS bổ sung KIN và NAA đã tăng cường khả năng nhân nhanh protocorm so với môi trường không có chất ĐHST, khả năng nhân nhanh tốt nhất trên môi trường chứa 1,0 mg/L KIN + 0,5 mg/L NAA với tỷ lệ mẫu protocorm nuôi cấy cảm ứng protocorm mới đạt 64,55% và khả năng nhân nhanh đáng kể sau 8 tuần (Bảng 2, Hình 1B). CW thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để kích thích sự hình thành protocorm [5]; ở đây việc bổ sung 15% CW vào môi trường nuôi cấy đã ảnh hưởng tích cực đến khả năng nhân nhanh protocorm, tăng 1,5 - 2,0 lần so với môi trường không bổ sung CW. Protocorm vẫn duy trì khả năng nhân nhanh trên môi trường chứa 1,0 mg/L KIN + 0,5 mg/L NAA + 15% CW với tỷ lệ mẫu cảm ứng protocorm đạt 91,1% (Bảng 2; Hình 1C). Mặc dù nhóm tác giả không thể xác định chính xác hệ số nhân nhanh do các protocorm tạo thành chồng chéo lẫn nhau, khó tách rời; tuy nhiên, căn cứ vào việc tăng thể tích mẫu thu được nhóm tác giả ước lượng hệ số nhân nhanh khoảng 2 - 3 lần trên môi trường tối ưu và các protocorm vẫn duy trì khả năng nhân nhanh qua nhiều lần cấy chuyển. Như vậy, việc bổ sung 1,0 mg/L KIN + 15% CW vào môi trường nuôi cấy đã mang lại hiệu quả nhân nhanh protocorm tương tự với môi trường nuôi cấy nhân nhanh protocorm đã thiết lập bởi Wu và cộng sự (2014), cho thấy tính hiệu quả của việc ứng dụng môi trường nuôi cấy này trong sản xuất, bởi thành phần môi trường đơn giản hơn [15].

3.3. Ảnh hưởng của KIN và NAA đến khả năng tái sinh chồi từ protocorm

Thông thường, các protocorm hình thành từ hạt có khả năng tiếp tục phân hóa tự nhiên thành chồi; tuy nhiên, để

tăng hiệu quả nhân giống *in vitro*, các chất ĐHST thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để kích thích sự nhân chồi từ protocorm [1]. Ảnh hưởng của NAA kết hợp với dịch chiết chuối (BH) đến khả năng tái sinh và sinh trưởng của chồi từ protocorm, với hiệu quả tốt nhất (95,67%) trên môi trường bổ sung 1,0 mg/L NAA + 100 g/L BH + 10% CW + 1,0 g/L pepton đã được báo cáo [15]. BH là chất bổ sung giàu cytokinin và dinh dưỡng có lợi cho sự hình thành chồi từ protocorm [1]. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã thay thế BH bởi KIN riêng lẻ và KIN kết hợp với 0,3 mg/L NAA để đánh giá khả năng nhân nhanh chồi. Môi trường có bổ sung chất ĐHST đã cho thấy ảnh hưởng tích cực đến sự hình thành chồi so với môi trường MS (Bảng 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của KIN và NAA đến khả năng nhân chồi sau 12 tuần nuôi cấy

KIN (mg/L)	NAA (mg/L)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)*	Số chồi/ mẫu
-	-	21,64	2,55 ^g
0,5	-	44,46	3,30 ^f
1,0	-	68,89	6,60 ^c
1,5	-	84,44	15,33^a
2,0	-	71,11	10,30 ^b
0,5	0,3	25,34	1,50 ^h
1,0	0,3	37,77	3,95 ^e
1,5	0,3	64,47	5,20 ^d
2,0	0,3	26,67	3,10 ^{fg}

* Các chữ cái khác nhau trong cùng 1 cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo Duncan's test với $p < 0,05$.

Khả năng hình thành chồi cao hơn đáng kể ở môi trường chỉ bổ sung KIN so với các môi trường còn lại. Sự nhân chồi tốt nhất với tỷ lệ mẫu tạo chồi đạt 84,44% và số chồi/mẫu đạt 15,33 khi nuôi cấy trên môi trường bổ sung 1,5 mg/L KIN (Bảng 3), chồi cao trung bình 0,3 - 0,4 cm, với 1-2 lá, chồi khỏe mạnh (Hình 1C). So với kết quả đã báo cáo bởi Wu và cộng sự [15], tỷ lệ protocorm tái sinh chồi trên môi trường bổ sung 1,5 mg/L KIN thấp hơn không đáng kể; tuy nhiên, hệ số nhân chồi tương đối cao đã thu được trên môi trường này. Như vậy, có thể kết luận rằng, sự bổ sung KIN vào môi trường nuôi cấy có thể thay thế vai trò của BH. Vai trò của một số loại cytokinin khác trong sự kích thích hình thành chồi từ protocorm ở nhiều loài lan khác nhau cũng đã được nhiều tác giả công bố trước đây [3, 9].

3.4. Ảnh hưởng của BA và NAA đến khả năng sinh trưởng chồi (kéo dài chồi)

Hoa lan có tốc độ sinh trưởng chậm, vì vậy, trong nhân giống *in vitro* nhiều tác giả đã khảo sát điều kiện nuôi cấy tiếp theo để thúc đẩy sự kéo dài chồi [10, 11]. Sau khi chồi lan Huyết nhung tron hình thành từ protocorm, Wu và cộng sự (2014) đã cấy chuyển chồi (dưới dạng plantlet) có chiều cao khoảng 2 cm, 3 lá, và 2 rễ sang môi trường Hyponex N016 có bổ sung 0,5 mg/L NAA + 1 g/L pepton + 150 g/L BH + 20% CW để tăng cường sự sinh trưởng của cây con, với chiều cao đạt 3,63 cm sau 8 tuần [15]. Mặc dù khả năng nhân nhanh chồi từ protocorm thu được trong nghiên cứu hiện tại là khá cao, nhưng chồi có chiều cao tương đối thấp 0,3 - 0,4 cm (Hình 1C); vì vậy, nhóm tác giả đã khảo sát ảnh hưởng của BA kết hợp với NAA ở các mức nồng độ khác nhau đến khả năng sinh trưởng của chồi (Bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của BA, NAA đến khả năng kéo dài chồi sau 8 tuần

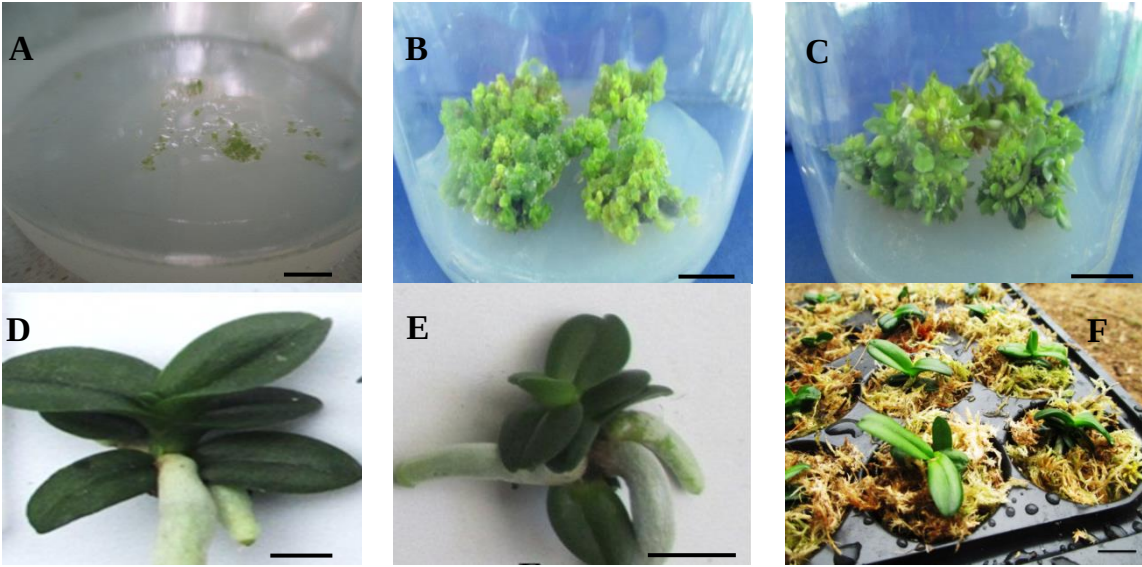
BA (mg/L)	NAA (mg/L)	Số lá/chồi	Chiều cao chồi (cm)*	Đặc điểm hình thái**
-	-	5,4 ^f	0,73 ^d	+
1,0	0,25	6,0 ^d	0,87 ^b	++
1,0	0,50	5,6 ^e	0,82 ^c	++
1,0	0,75	5,5 ^{ef}	0,74 ^d	++
1,0	1,00	5,3 ^g	0,72 ^d	++
2,0	0,25	6,8^a	1,07^a	++++
2,0	0,50	6,3 ^b	0,88 ^b	+++
2,0	0,75	6,2 ^c	0,85 ^{bc}	+++
2,0	1,00	6,1 ^d	0,83 ^c	++

* Các chữ cái khác nhau trong cùng 1 cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo Duncan's test với $p < 0,05$.

** Đặc điểm sinh trưởng của chồi được thể hiện qua các kí hiệu: ++++: chồi to, khỏe, lá xanh đậm; +++: chồi nhỏ, lá xanh đậm; ++: chồi nhỏ, lá xanh nhạt; +: chồi nhỏ, yếu.

Sự bổ sung kết hợp BA và NAA ở các tỷ lệ khác nhau cho thấy ảnh hưởng tích cực đến khả năng sinh trưởng của chồi so với môi trường MS (Bảng 4). Ở cùng một mức nồng

độ NAA, sự bổ sung 2,0 mg/L BA đã ảnh hưởng tốt hơn so với 1,0 mg/L BA, và chiều cao chồi đạt giá trị lớn nhất (1,07 cm) ở môi trường bổ sung kết hợp 2,0 mg/L BA + 0,25 mg/L NAA với 6,8 lá, lá có màu xanh, khỏe mạnh (Hình 1D). Với cùng một nồng độ BA, sự sinh trưởng của chồi có xu hướng giảm dần theo sự tăng dần nồng độ NAA (Bảng 4). BA là cytokinin có vai trò quan trọng trong việc điều hòa sự sinh trưởng của chồi và phát triển ở thực vật, sự có mặt của BA ở nồng độ thích hợp trong môi trường nuôi cấy cũng đã cho thấy ảnh hưởng tích cực đến khả năng sinh trưởng chồi ở nhiều loài lan [7, 11]. Seeni và cộng sự (1992) đã sử dụng môi trường bổ sung 44,4 μ M BA + 10,7 μ M NAA + 35,0 g/L BH + 2,0 g/L pepton để kích thích sự phát triển chồi từ mẫu lá non của lan Huệ huyết nhung tron [11]. Ảnh hưởng tương tự của tổ hợp BA và NAA cũng đã thu được trong kết quả của nhóm tác giả. Tuy nhiên, so với điều kiện đã được thiết lập bởi Wu và cộng sự [15], sự kéo dài của chồi trên các môi trường đã khảo sát trong nghiên cứu này vẫn còn hạn chế, điều này có thể cho thấy vai trò tích cực của các chất bổ sung (BH, pepton, AC) trong sự kéo dài của chồi ở loài lan này.



Hình 1. Đặc điểm hình thái của lan Huệ huyết nhung tron qua các giai đoạn nuôi cấy khác nhau. A - Hạt này mầm trên môi trường MS + 30 g/L sucrose sau 45 ngày; B - Các protocorm nhân nhanh trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L KIN + 0,5 mg/L + 15% CW + 1,0 g/L AC + 30 g/L sucrose sau 8 tuần; C - Chồi tái sinh từ protocorm trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L KIN + 15% CW + 30 g/L sucrose sau 12 tuần. D: Chồi sinh trưởng trên môi trường MS + 2,0 mg/L BA + 0,25 mg/L NAA + 15% CW + 30 g/L sucrose sau 8 tuần. E: Rễ hình thành trên môi trường MS + 1,0 mg/L NAA sau 8 tuần. Cây con trồng ở giá thể dớn + than (1:1) duy trì ở vườn ươm sau 2 tuần

3.5. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng tạo rễ

Bảng 5. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng tạo rễ sau 8 tuần

NAA (mg/L)	Thời gian xuất hiện rễ (ngày)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)
-	41	60,00	1,26 ^c	1,30 ^b
0,25	46	53,33	0,86 ^d	0,63 ^d
0,50	35	66,67	1,34 ^{bc}	0,76 ^c
0,75	31	80,00	1,51 ^b	1,35 ^b
1,00	25	93,30	2,40^a	1,74^a

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trong cùng 1 cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo Duncan's test với $p < 0,05$.

NAA là auxin được sử dụng phổ biến để kích thích sự tái sinh rễ bất định trong nuôi cấy mô tế bào thực vật. Nhiều tác giả cũng đã cho thấy NAA riêng lẻ đã kích thích tạo rễ đáng kể ở một số loài lan, như: *Dendrobium chrysotoxum* [12], *Dendrobium strongylanthum* Rchb.f [8]. Ở đây, nhóm tác giả đã sử dụng NAA với nồng độ từ 0,25 – 1,0 mg/L để cảm ứng sự tạo rễ từ chồi lan Huệ huyết nhung tron (Bảng 5). Kết quả cho thấy sự bổ sung NAA đã có ảnh hưởng đến sự hình thành rễ từ chồi so với môi trường MS, khả năng kích thích tạo rễ tăng dần khi nồng độ NAA tăng từ 0,5 đến 1,0 mg/L (Bảng 5). Tỷ lệ chồi ra rễ (93,30%), số rễ/chồi (2,4) và chiều dài rễ (1,74 cm) đạt giá trị lớn nhất trên môi trường chứa 1,0 mg/L NAA sau 8 tuần (Bảng 5); sinh trưởng của chồi có

xu hướng tốt hơn và rễ có đường kính to khỏe (Hình 1E). Mặc dù không đánh giá tách biệt hẳn giai đoạn cảm ứng rễ như thí nghiệm của nhóm tác giả, nhưng báo cáo của Wu và cộng sự cũng cho thấy, trên môi trường nuôi cấy sử dụng để tăng cường sự phát triển của cây con có chứa 0,5 mg/L NAA có hiệu quả tạo rễ tốt nhất, phù hợp với kết quả mà nhóm tác giả đã thu được [15].

3.6. Sự thích nghi của cây con

Với sự khác biệt giữa điều kiện nuôi cấy *in vitro* và vườn ươm nên cây con sẽ phải trải qua giai đoạn thích nghi khi chuyển từ môi trường nuôi cấy *in vitro* ra vườn ươm [1, 3]. Quy trình nhân giống *in vitro* sẽ không có hiệu quả nếu cây con không có khả năng thích nghi tốt.

Bảng 6. Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng sống sót sau 2 tuần

Giá thể	Tỷ lệ sống sót (%)	Trạng thái cây con
Dớn	75,0	Cây xanh, rễ đen
Dớn + than (1:1)	91,6	Cây xanh tươi
Dớn + than + xơ dừa (1:1:1)	83,3	Cây xanh tươi

Trong nghiên cứu này, các cây con sau khi tạo rễ ở môi trường thích hợp (Bảng 5) đã được trồng với 03 loại giá thể khác nhau (Bảng 6) và duy trì ở vườn ươm với điều kiện nhiệt độ trung bình $28 \pm 3^\circ\text{C}$, độ ẩm 80 - 90%. Sau 02 tuần tỷ lệ cây con sống sót tương đối cao, đạt từ 75,0 - 91,6%; trong đó, giá thể có chứa dớn + than (1:1) cho tỷ lệ sống cao nhất (91,6%), và các cây con sống sót không cho thấy bất kì dấu hiệu suy yếu, lá khỏe mạnh (Hình 1F). Dớn đã được sử dụng để trồng cây con Huyết nhưng tron trong nghiên cứu của Wu và cộng sự (2014) với tỷ lệ sống tương đối cao (95%) sau 60 ngày [15], trong khi tỷ lệ này chỉ đạt 75% khi trồng trên giá thể dớn ở trong thí nghiệm của nhóm tác giả, sự khác biệt này có thể do ảnh hưởng của điều kiện vườn ươm ở hai thí nghiệm. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả cho thấy, bổ sung kết hợp than đã nâng cao tỷ lệ sống sót của cây so với việc chỉ sử dụng dớn riêng lẻ.

4. Kết luận

Căn cứ vào sự so sánh các kết quả thu được trong nghiên cứu này với kết quả báo cáo bởi Wu và cộng sự (2014) cho thấy, việc bổ sung KIN vào môi trường nuôi cấy đã thúc đẩy đáng kể quá trình nhân nhanh *in vitro* ở giai đoạn tạo protocorm và tái sinh chồi (Bảng 2-3). Kết

quả nghiên cứu đã đưa ra một quy trình nhân giống *in vitro* hiệu quả đối với cây lan Huyết nhưng tron từ hạt với tỷ lệ sống sót cao trong điều kiện vườn ươm.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ, Đại học Đà Nẵng trong đề tài mã số B2016-DNA-35-TT.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Arditti J., *Micropropagation of orchids*, John Wiley & Sons, 2009.
- [2] Chen S., Liu Z., Zhu G., Lang K., Tsi Z., Luo Y., *Flora of China*, Beijing: Science Press, 2009.
- [3] Chugh S., Guha S., Rao I.U., "Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants", *Scientia Horticulturae*, 122 (4), 2009, pp. 507-520.
- [4] De Pauw M., Remphrey W., Palmer C., "The cytokinin preference for *in vitro* germination and protocorm growth of *Cypripedium candidum*", *Annals of Botany*, 75 (3), 1995, pp. 267-275.
- [5] Griesbach R., *Orchid tissue culture: Tissue culture as a plant production system for horticultural crops*, Springer, 1986.
- [6] Hộ P.H., *Cây cỏ Việt Nam*, NXB Trẻ, 2000.
- [7] Hossain M., Sharma M., Da Silva J.A.T., Pathak P., "Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl", *Scientia Horticulturae*, 123 (4), 2010, pp. 479-487.
- [8] Kong Q., Yuan S., Végvári G., "Micropropagation of an orchid *Dendrobium strongylanthum* Rchb. f", *International Journal of Horticultural Science*, 13 (1), 2007, pp. 61-64.
- [9] Martin K., Madassery J., "Rapid *in vitro* propagation of the threatened endemic orchid, *Ipsa malabarica* (Reichb. f.) JD Hook through protocorm-like bodies", *Indian J Exp Biol*, 2005, pp. 237-245.
- [10] Nayak N., Patnaik S., Rath S., "Direct shoot regeneration from foliar explants of an epiphytic orchid, *Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatter and McCann", *Plant Cell Reports*, 16 (8), 1997, pp. 583-586.
- [11] Seeni S., Latha P., "Foliar regeneration of the endangered red vanda, *Renanthera imschootiana* Rolfe (Orchidaceae)", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 29 (3), 1992, pp. 167-172.
- [12] Song N. V., Vĩnh P. H., Phương T. T. B., "Nhân nhanh *in vitro* lan Kim điệp (*Dendrobium chrysotoxum*) – Một loài lan rừng có nguy cơ tuyệt chủng", *Tạp chí Khoa học Đại học Huế*, 64 (1), 2013, pp. 23-29.
- [13] Thới H. V., *Cẩm nang nuôi trồng và kinh doanh phong lan*, NXB Trẻ, 2006.
- [14] Wu K., Zeng S., da Silva J.A.T., Chen Z., Zhang J., Yang Y., Duan J., "Efficient regeneration of *Renanthera Tom Thumb* 'Qilin' from leaf explants", *Scientia Horticulturae*, 135, 2012, pp.194-201.
- [15] Wu K., Zeng S., Lin D., da Silva J.A.T., Bu Z., Zhang J., Duan J., "In vitro propagation and reintroduction of the endangered *Renanthera imschootiana* Rolfe", *PloS one*, 9 (10), 2014.