VI NHÂN GIỐNG LAN KIỀU VUÔNG *DENDROBIUM FAMERI* PAXT

MICROPROPAGATION OF *DENDROBIUM FAMERI* PAXT

Võ Thanh Phúc*, Phạm Thanh Hiền

Trường Đại học Bách khoa, Đại học quốc gia Tp. Hồ Chí Minh[1]

*Tác giả liên hệ: vothanhphuc@hcmut.edu.vn

(Nhận bài: 22/7/2021; Chấp nhận đăng: 20/9/2021)

Tóm tắt - Lan kiều vuông (*Dendrobium fameri* Paxt) là một loài lan rừng có vẻ đẹp nhẹ nhàng. Loài lan này được ưa chuộng không chỉ riêng tại Việt Nam mà còn nhiều nơi trên thế giới. Nghiên cứu tiến hành bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật và các chất hữu cơ vào các giai đoạn của quá trình vi nhân giống lan kiều vuông. Kết quả cho thấy, PLBs tăng sinh tốt nhất trên môi trường MS ½ bổ sung BA 1,5 mg/L và NAA 0,5 mg/L. Môi trường MS ½ bổ sung BA 0,5 mg/L và NAA 0,5 mg/L thích hợp cho quá trình tái sinh chồi từ PLBs (187,5 chồi/ mẫu). Môi trường MS ½ bổ sung BA 1,0 mg/L và NAA 0,5 mg/L thích hợp cho sự sinh trưởng của cụm chồi lan kiều vuông (chỉ số tăng trưởng là 2,54). Môi trường thích hợp cho sự tạo rễ *in vitro* là MS ½ bổ sung chuối 60 g/L (100% chồi ra rễ; 9,0 rễ/ mẫu). Chitosan 30 mg/L có tác dụng tích cực lên quá trình vươn thân và ra rễ của cây lan kiều vuông (100% chồi ra rễ; 5,75 rễ/ mẫu).

Từ khóa - Chất hữu cơ; chitosan; *Dendrobium fameri* Paxt; PLBs; vi nhân giống

Abstract - *Dendrobium fameri* Paxt is a type of forest orchid with gentle beauty. This orchid is popular not only in Vietnam but also in many parts of the world. This study investigated the effects of plant growth regulators and organic additives on the stages of micropropagation of *Dendrobium fameri* Paxt. The results showed that PLBs proliferated best on MS ½ medium supplemented with BA 1.5 mg/L and NAA 0.5 mg/L. MS ½ medium supplemented with BA 0.5 mg/L and NAA 0.5 mg/L was suitable for shoot regeneration from PLBs (187.5 shoots/ explant). MS ½ medium supplemented with BA 1,0 mg/L and NAA 0.5 mg/L was suitable for the growth of shoot clusters (growth index was 2.54). Root formation is the most suitable on MS ½ medium supplemented with banana extract 60 g/L (100% shoots rooted; 9.0 roots/ explant). Chitosan 30 mg/L had a positive effect on the growth and rooting of plantlets (100% shoots rooted; 5.75 roots/ explant).

Key words - Organic additives; chitosan; *Dendrobium fameri* Paxt; PLBs; micropropagation

1. Đặt vấn đề

Dendrobium farmeri Paxt có tên gọi là lan kiều vuông, kiều trắng, thủy tiên trắng, thủy tiên trắng thân vuông. Loài lan này phân bố từ Nam Á đến Đông Nam Á. Tại Việt Nam, cây có ở các khu vực Tuyên Quang, Vinh, Hà Tĩnh, Kontum, Gia Lai, Lâm Đồng. Lan kiều vuông có đặc tính rất dễ trồng, siêng hoa, hoa thơm và màu sắc rất bắt mắt. Cây cao khoảng 15 - 20 phân. Thân phình to ở giữa, có hình vuông 4 cạnh, thường mọc dựng lên theo hướng ánh nắng. Ngọn nhỏ có khoảng 3 – 5 lá. Hoa mọc thành chùm, cánh trắng họng vàng, thường nở vào mùa Xuân [1].

Lan kiều vuông là một loài hoa biểu tượng của nét đẹp vương giả, tinh tế và hiếm thấy nên được rất nhiều người ưa chuộng. Hiện nay, nhu cầu trồng loài lan này làm cảnh ngày càng tăng. Tuy nhiên, hệ số nhân giống của loài này trong tự nhiên là rất thấp. Phương pháp vi nhân giống thông qua protocorm/protocorm - like bodies (PLBs) được nhận thấy rất hiệu quả trong nhân giống các loài lan nói chung và *Dendrobium* nói riêng [2]. Nghiên cứu về vi nhân giống cây lan kiều vuông ở nước ta và trên thế giới còn khá ít [3, 4]. Các nghiên cứu về vi nhân giống *Dendrobium* tập trung vào lựa chọn mẫu cấy, môi trường nuôi cấy, chất điều hòa sinh trưởng thực vật, điều kiện nuôi cấy. Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật thường được sử dụng là một loại cytokinin (BA, KIN, TDZ) kết hợp với một loại auxin (IAA, NAA, IBA). Các chất hữu cơ thường dùng là nước dừa, chuối, khoai tây,… [5].

Các nhà khoa học cũng tiến hành bổ sung chitosan vào các giai đoạn khác nhau trong quá trình vi nhân giống lan *Dendrobium* nhằm nâng cao hệ số nhân giống và chất lượng cây con. Hợp chất này giúp cây con tăng trưởng tốt, cải thiện đáng kể chiều cao và sự hình thành rễ mới, tăng khả năng sống sót của cây con khi được chuyển ra vườn ươm [6, 7].

Nghiên cứu tiến hành khảo sát ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến sự tăng sinh, tái sinh chồi và nhân nhanh cụm chồi lan kiều vuông. Bên cạnh đó, ảnh hưởng của các chất hữu cơ như dịch chiết chuối, khoai tây, chitosan lên quá trình tạo cây hoàn chỉnh cũng được tiến hành, nhằm hoàn thiện qui trình vi nhân giống loài lan này.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Trái lan kiều vuông được thu nhận tại Lâm Đồng, sau đó được khử trùng. Hạt được gieo trên môi trường MS bổ sung BA 1 mg/L, nước dừa 10%, sucrose 30 g/l, than hoạt tính 1 g/l. PLBs và chồi lan kiều vuông được sử dụng làm mẫu cấy trong thí nghiệm.

Các mẫu được nuôi cấy ở nhiệt độ 25 ± 2°C, độ ẩm trung bình 70%, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 4000 lux.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ BA đến khả năng tăng sinh PLBs và tái sinh chồi lan kiều vuông

Mẫu cấy là cụm PLBs lan kiều vuông 2 tháng tuổi có trọng lượng tươi 250 ± 10 mg. Môi trường nuôi cấy là môi trường MS [8] có hàm lượng khoáng đa lượng giảm đi một nửa (MS ½) bổ sung sucrose 30 g/L, nước dừa 10%, NAA

[1] Ho Chi Minh city University of Technology (Vo Thanh Phuc, Pham Thanh Hien)

0,5 mg/L, BA với các nồng độ 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L, agar 7 g/L.

Trọng lượng tươi (TLT), số chồi tái sinh/ mẫu cấy, chiều cao chồi, số lá và hình thái mẫu được ghi nhận sau 6 tuần nuôi cấy.

$$\text{Chỉ số tăng trưởng} = \frac{\text{TLT lúc sau - TLT lúc đầu}}{\text{TLT lúc đầu}}$$

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ BA lên khả năng tăng sinh của cụm chồi lan kiều vuông

Mẫu cấy là cụm chồi lan kiều vuông 2 tháng tuổi có trọng lượng tươi 500 ± 10 mg. Môi trường nuôi cấy là MS ½ bổ sung sucrose 30 g/L, nước dừa 10%, NAA 0,5 mg/L, BA với các nồng độ 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L, agar 7 g/L.

Chiều cao chồi, số lá/chồi, hình thái chồi và chỉ số tăng trưởng được ghi nhận sau 6 tuần nuôi cấy.

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của dịch chiết chuối và khoai tây lên khả năng tạo cây lan kiều vuông hoàn chỉnh

Mẫu cấy là chồi lan kiều vuông có chiều cao 15 ± 0,5 mm, trọng lượng tươi 100 ± 5 mg. Khoai tây/chuối sứ chín được rửa sạch, bỏ vỏ, cắt nhỏ, xay nhuyễn bằng máy xay sinh tố trước khi bổ sung vào môi trường. Môi trường nuôi cấy là MS 1/2 có bổ sung sucrose 20 g/L, nước dừa 10%, chuối (20; 40; 60 g/L) hoặc khoai tây (20; 40; 60 g/L), than hoạt tính 1 g/L, agar 7 g/L. Đối chứng là các mẫu được nuôi trên môi trường không bổ sung chuối và khoai tây.

Chiều cao cây, tỉ lệ ra rễ, số rễ, chiều dài rễ và hình thái cây được ghi nhận sau 4 tuần nuôi cấy.

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chitosan lên khả năng tạo cây lan kiều vuông hoàn chỉnh

Mẫu cấy tương tự như thí nghiệm ở Mục 2.2.3. Chitosan được cung cấp bởi công ty Bio Basic (có nguồn gốc từ vỏ cua), mức độ khử acetyl là 90%. Môi trường nuôi cấy là MS 1/2 bổ sung sucrose 20 g/L, nước dừa 10 %, chitosan với các nồng độ 0; 10; 20; 30; 40; 50; 60 mg/L, than hoạt tính 1 g/L, agar 7 g/L.

Chiều cao cây, tỉ lệ ra rễ, số rễ, chiều dài rễ, chỉ số tăng trưởng và hình thái cây được ghi nhận sau 4 tuần nuôi cấy.

2.3. Phân tích thống kê

Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS phiên bản 2019, phương pháp ANOVA một chiều và Duncan test.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ BA lên khả năng tăng sinh PLBs và tái sinh chồi lan kiều vuông

Sau 2 tuần nuôi cấy, cụm PLBs bắt đầu tái sinh chồi. Ở tuần thứ 4, PLBs tăng sinh nhanh ở các nghiệm thức bổ sung BA 1,0 và 1,5 mg/L. Kết quả sau 6 tuần nuôi cấy được trình bày ở Bảng 1.

Chỉ số tăng trưởng của mẫu đạt cao nhất trên môi trường bổ sung BA 0,5 mg/L kết hợp với NAA 0,5 mg/L và đối chứng. Tuy nhiên, trọng lượng tươi thu được này là bao gồm trọng lượng của cả PLBs và các chồi tái sinh từ PLBs. Về hình thái, PLBs có màu xanh đậm, tròn và to, tăng sinh tốt ở nghiệm thức bổ sung BA 1,5 mg/L kết hợp với NAA 0,5 mg/L. BA kích thích sự phân chia tế bào, gia tăng kích thước tế bào và sinh tổng hợp protein [5]. Sự kết hợp giữa BA và NAA cho thấy kết quả rất tốt trong nuôi cấy tế bào các loại lan như Hồ điệp, Giả hạc, Ngọc điểm [9].

Bảng 1. *Khả năng tăng sinh PLBs và tái sinh chồi lan kiều vuông sau 6 tuần nuôi cấy trên các môi trường bổ sung NAA 0,5 mg/L kết hợp với BA ở các nồng độ khác nhau*

BA (mg/L)	Chỉ số tăng trưởng	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (mm)	Số lá/ chồi	Hình thái chồi	Hình thái PLBs
0	2,74 ^{a}	274,5 ^{a}	4,33 ^{a}	2,33 ^{b}	++	*
0,5	2,69 ^{a}	187,5 ^{b}	4,67 ^{a}	3,27 ^{a}	+++	*
1,0	1,81 ^{b}	136,5 ^{c}	3,33 ^{b}	1,47 ^{c}	++	*
1,5	2,13 ^{b}	61,0 ^{d}	3,53 ^{b}	1,47 ^{c}	+	**
2,0	2,14 ^{b}	137,5 ^{bc}	2,60 ^{c}	1,47 ^{c}	+	*

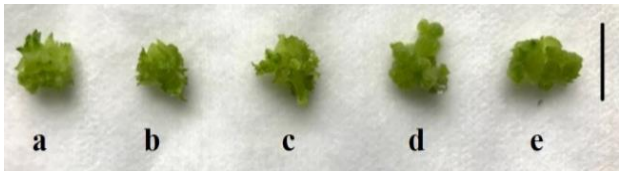
Ghi chú: Những mẫu tự khác nhau (a, b, c, d) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong phép thử Duncan;

+ chồi nhỏ, thấp; ++: chồi mảnh, lá xanh nhạt; +++: chồi mập, cao, nhiều lá, lá xanh đậm;

**: PLBs nhỏ, xanh nhạt, **: PLBs to, xanh đậm.*

Khi nồng độ BA tăng lên 2,0 mg/L, PLBs kém phát triển, có màu xanh nhạt, kích thước nhỏ. Nguyên nhân có thể do nồng độ BA cao đã ức chế khả năng tăng sinh của PLBs. BA 0,5 mg/L giúp protocorm lan Thạch hộc thiết bì (*Dendrobium officinale* Kimura *et* Migo) tăng sinh khối tốt. Tuy nhiên, BA được bổ sung ở nồng độ cao (2 mg/L) thì lượng protocorm thu được giảm đáng kể [9]. Khatun và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu sự tăng sinh của PLBs lan *Dendrobium* trên môi trường MS bổ sung BA với các nồng độ khác nhau. Ở nồng độ BA 1 mg/L, kích thước cụm và khối lượng PLBs tăng nhanh. Khi tăng nồng độ BA lên 2 mg/L, khối lượng PLBs giảm xuống 2 lần so với BA 1 mg/L [10].

Sau 6 tuần nuôi cấy, tỉ lệ tạo chồi ở tất cả các nghiệm thức là 100%. Số chồi tái sinh/mẫu cấy đạt cao nhất ở nghiệm thức đối chứng (không bổ sung BA và NAA), đạt 274,5 chồi. Chồi tái sinh có chiều cao và số lá lớn nhất trên môi trường bổ sung BA 0,5 mg/L và NAA 0,5 mg/L (4,67 mm và 3,27 lá/ chồi). Ở nghiệm thức này, chồi cũng có hình thái tốt nhất (chồi mập, cao, có nhiều lá, lá xanh đậm). Ở nghiệm thức đối chứng, chồi mảnh, có màu xanh nhạt (Hình 1).



Hình 1. *Mẫu cấy ở các môi trường bổ sung NAA 0,5 mg/L và BA nồng độ khác nhau sau 6 tuần nuôi cấy (thanh kích thước 1 cm)*

a) BA 0 g/L; b) BA 0,5 g/L; c) BA 1,0 g/; d) BA 1,5 mg/L; e) BA 2,0 mg/L

Trên các môi trường có nồng độ BA cao hơn (1 - 2 mg/L), chồi nhỏ, thấp. Số lượng chồi tái sinh cũng giảm dần. Số chồi/ mẫu đạt thấp nhất trên môi trường có BA 1,5 mg/L (61,00 chồi). Đặng Thị Thắm và cộng sự đã tiến hành vi nhân giống lan nhất điểm hoàng *Dendrobium heterocarpum* Lindl; Nhận thấy BA ở nồng độ thấp có tác dụng thúc đẩy PLBs tạo chồi; Tuy nhiên, khi nồng độ BA tăng lên cao lại kìm hãm PLBs phát triển thành chồi [11].

Như vậy, môi trường MS ½ bổ sung BA 1,5 mg/L và NAA 0,5 mg/L là phù hợp cho sự tăng sinh PLBs. Trong khi đó, sự kết hợp giữa BA 0,5 mg/L và NAA 0,5 mg/L là phù hợp để tái sinh chồi từ PLBs lan kiều vuông.

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ BA lên khả năng sinh trưởng của cụm chồi lan kiều vuông

Sau 2 tuần nuôi cấy, cụm chồi trên các nghiệm thức có sự gia tăng chiều cao. Sự sinh trưởng của cụm chồi lan kiều vuông sau 6 tuần nuôi cấy được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. *Khả năng sinh trưởng của cụm chồi sau 6 tuần nuôi cấy trên các môi trường bổ sung NAA 0,5 mg/L và BA ở các nồng độ khác nhau*

BA (mg/L)	Chỉ số tăng trưởng	Chiều cao chồi (mm)	Số lá/chồi	Hình thái chồi
0	1,92 ^{b}	7,33 ^{bc}	1,94 ^{b}	++
0,5	2,33 ^{a}	6,67 ^{c}	2,72 ^{a}	++
1,0	2,54 ^{a}	8,38 ^{ab}	2,50 ^{a}	+++
1,5	1,86 ^{b}	9,17 ^{a}	2,56 ^{a}	+
2,0	1,11 ^{c}	6,67 ^{c}	2,61 ^{a}	+

Ghi chú: Những mẫu tự khác nhau (a, b, c, d) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với P ≤ 0,05 trong phép thử Duncan.

+: Chồi mảnh, xanh nhạt;

++: Chồi mập, xanh nhạt;

+++: Chồi mập, xanh đậm.

Khi nồng độ BA tăng từ 0 – 1,0 mg/L, chỉ số tăng trưởng tăng dần. Khi nồng độ BA cao hơn, sự gia tăng trọng lượng tươi giảm (Bảng 2). Nguyên nhân có thể do nồng độ BA cao gây ức chế sự tăng sinh của cụm chồi. Điều này cũng phù hợp với nghiên cứu của Lê Thị Diễm và cộng sự [12]. Trên môi trường khoáng MS, sự hình thành chồi lan Thạch hộc tốt nhất trên môi trường có bổ sung BA 1,0 mg/L. Chồi phát triển đồng đều có màu xanh đậm, chồi to khỏe. Tuy nhiên, khi nồng độ BA tăng cao hơn thì số chồi trên mỗi cụm giảm, chồi chậm phát triển, chồi mập và ngắn [12].

Trên môi trường bổ sung BA 1,5 mg/L và NAA 0,5 mg/L, chiều cao chồi đạt kết quả tốt nhất (9,17 mm). Tuy nhiên, chồi rất ốm và có màu xanh nhạt. Trên môi trường bổ sung BA 1,0 mg/L, chiều cao chồi thấp hơn (8,38 mm) nhưng chồi có hình thái tốt hơn (chồi mập, có màu xanh đậm, có xuất hiện rễ) (Hình 2). Trên môi trường bổ sung BA 2,0 mg/L, chiều cao chồi thấp hơn (chỉ đạt 6,67 mm). Nguyên nhân là do BA ở nồng độ cao đã ức chế sự kéo dài của chồi. Nồng độ cytokinin quá cao sẽ kích thích sự hình thành của nhiều chồi nhỏ nhưng những chồi này không thể kéo dài [13].

Hình 2. *Mẫu cấy cụm chồi ở các môi trường bổ sung NAA 0,5 mg/L và BA nồng độ khác nhau sau 6 tuần nuôi cấy (thanh kích thước 1 cm)*

a) BA 0 g/L; b) BA 0,5 g/L; c) BA 1,0 g/; d) BA 1,5 mg/L; e) BA 2,0 mg/L

Số lá/ chồi không có sự khác biệt về mặt thống kê giữa các nghiệm thức có bổ sung BA kết hợp với NAA. Tuy nhiên, số lá/chồi ở những nghiệm thức này đều cao hơn so với đối chứng. BA là một loại cytokinin có hiệu quả cao trong cảm ứng tạo chồi ở nhiều loài thực vật và được sử dụng rộng rãi hơn các loại cytokinin khác. Thông thường, trong quá trình tạo chồi người ta sử dụng auxin nồng độ thấp kết hợp cùng với cytokinin ở nồng độ cao [13]. Trong thí nghiệm này, việc bổ sung phối hợp BA và NAA đã làm cho hệ số nhân của chồi tăng lên rõ rệt.

Như vậy, dựa trên các số liệu và hình thái thu được, BA 1,0 mg/L kết hợp với NAA 0,5 mg/L là phù hợp nhất cho sự tăng trưởng của cụm chồi lan kiều vuông.

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của chuối và khoai tây lên khả năng tạo cây lan kiều vuông hoàn chỉnh

Bảng 3. *Ảnh hưởng của chuối và khoai tây đến khả năng tạo cây hoàn chỉnh lan kiều vuông sau 4 tuần nuôi cấy*

Nồng độ chất hữu cơ (g/L)		Chiều cao cây (mm)	Tỷ lệ tạo rễ	Số rễ/ mẫu	Chiều dài rễ (mm)	Hình thái cây
Chuối	Khoai tây					
0	0	17,16 ^{c}	50%	1,50 ^{c}	5,70 ^{ab}	+
20	0	22,67 ^{bc}	100%	6,25 ^{a}	1,70 ^{c}	+
40		25,67 ^{ab}	80%	6,50 ^{a}	2,60 ^{c}	++
60		29,50 ^{a}	100%	9,00 ^{a}	4,90 ^{b}	++++
0	20	24,33 ^{ab}	83%	4,25 ^{b}	1,90 ^{c}	+
	40	22,33 ^{bc}	75%	5,25 ^{ab}	5,4 ^{ab}	++
	60	21,50 ^{bc}	88%	5,00 ^{b}	6,60 ^{a}	+++

Ghi chú: Những mẫu tự khác nhau (a, b, c, d) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với P ≤ 0,05 trong phép thử Duncan

+: Thân mảnh, thấp, xanh nhạt, lá nhỏ, rễ ốm;

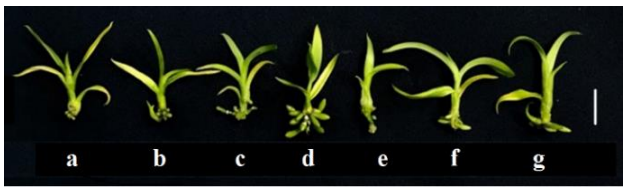
++: Thân trung bình, xanh đậm, lá to, rễ ốm;

+++: Thân mập, xanh đậm, lá to, rễ mập;

+++: Thân mập, xanh đậm, lá rất to, rễ mập và nhiều.

Kết quả từ Bảng 3 cho thấy, sự sinh trưởng của cây trên môi trường có bổ sung chuối hoặc khoai tây tốt hơn các mẫu trên môi trường đối chứng (không bổ sung các dịch chiết hữu cơ).

Trên các môi trường bổ sung dịch chiết chuối, cây có xu hướng cao hơn trên các môi trường có bổ sung khoai tây. Chiều cao cây trên môi trường có bổ sung chuối dao động là 22,67 – 29,50 mm. Trong khi đó, chiều cao cây trên môi trường bổ sung khoai tây là 21,5 – 24,33 mm. Trên môi trường bổ sung chuối 60 g/L, cây con có chiều cao lớn nhất (29,50 mm). Cây con ở nghiệm thức này cũng có chất lượng tốt nhất (cây cao, xanh đậm, lá rất to, rễ mập và khỏe) (Hình 3). Duongruitai Nicomrat cũng thu được kết quả tương tự; Môi trường có bổ sung chuối Namwa ở nồng độ 150 g/l giúp cây con *Dendrobium farmeri* Paxt tăng trưởng tốt [3].



Hình 3. *Cây lan kiều vuông trên các môi trường bổ sung chuối và khoai tây sau 4 tuần nuôi cấy (thanh kích thước 1 cm)*

a) Đối chứng; b) chuối 20 g/L; c) chuối 40 g/L; d) chuối 60 g/L; e) khoai tây 20 g/L; f) khoai tây 40 g/L; g) khoai tây 60 g/L

Bổ sung chuối vào môi trường nuôi cấy cũng ảnh hưởng tích cực đến tỷ lệ tạo rễ và số rễ/cây con của lan kiều vuông *in vitro*. Các nghiệm thức bổ sung chuối có tỷ lệ tạo rễ (từ 80 – 100 %) và số rễ/cây con (6,25 – 9,00 rễ/cây), cao hơn so với các nghiệm thức bổ sung khoai tây (tỷ lệ tạo rễ 75 - 88%; 4,25 – 5,25 rễ/cây con). Việc bổ sung chuối và khoai tây vào môi trường nuôi cấy đã được rất nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu [5]. Chuối có hàm lượng fructose, glucose và nitrate cao, khi được bổ sung vào môi trường nuôi cấy làm tăng nồng độ đường cũng như nồng độ khoáng của môi trường [14]. Bên cạnh cung cấp carbohydrate và các ion, dịch chiết chuối còn chứa một số chất điều hòa sinh trưởng thực vật tự nhiên như IAA, gibberellin, cytokinin [15].

Tuy chuối kích thích sự ra rễ ở lan kiều vuông, khoai tây lại kích thích sự kéo dài của rễ. Chiều dài rễ của cây lan kiều vuông trên môi trường bổ sung chuối (1,7 – 4,9 mm) thấp hơn so với trên môi trường bổ sung khoai tây (1,9 – 6,6 mm) và đối chứng (5,7 mm). Khoai tây là một loại củ rất giàu các acid amin như lysine, methionine, threonine, tryptophan, vitamin C, vitamin B6, khoáng đặc biệt rất giàu sắt, rất thích hợp cho sự sinh trưởng của mô nuôi cấy [9].

Kết hợp giữa số liệu và hình thái thu được, chuối 60 g/L là thích hợp cho sự hình thành cây lan kiều vuông hoàn chỉnh.

3.4. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chitosan lên khả năng tạo cây lan kiều vuông hoàn chỉnh

Kết quả sau 4 tuần nuôi cấy cho thấy, chitosan ở các nồng độ khác nhau có ảnh hưởng khác nhau lên khả năng vươn thân và ra rễ của lan kiều vuông. Chiều cao của cây con có sự thay đổi theo từng nghiệm thức nhưng không có khác biệt về mặt thống kê giữa các nghiệm thức (Bảng 4).

Bảng 4. *Ảnh hưởng của chitosan đến khả năng tạo cây hoàn chỉnh lan kiều vuông sau 4 tuần nuôi cấy*

Chitosan (mg/L)	Chỉ số tăng trưởng	Chiều cao cây (mm)	Số rễ	Chiều dài rễ (mm)	Hình thái cây
0	3,30 ^{ab}	23,80 ^{a}	3,60 ^{a}	4,31 ^{b}	+
10	2,27 ^{b}	26,40 ^{a}	4,80 ^{a}	4,00 ^{b}	+
20	2,75 ^{b}	22,67 ^{a}	5,60 ^{a}	2,57 ^{c}	+
30	4,71 ^{a}	25,00 ^{a}	5,75 ^{a}	5,36 ^{a}	++++
40	3,56 ^{ab}	25,42 ^{a}	5,28 ^{a}	3,83 ^{b}	++
50	3,60 ^{ab}	20,50 ^{a}	7,20 ^{a}	3,48 ^{b}	+++
60	2,56 ^{b}	26,57 ^{a}	3,87 ^{a}	4,24 ^{b}	+++

Ghi chú: Những mẫu tự khác nhau (a, b, c, d) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong phép thử Duncan

+: Thân mảnh, xanh nhạt, rễ ốm;

++: thân trung bình, xanh đậm, rễ mập;

+++ Thân mập, lá to và khỏe;

++++: Thân mập, có lá mới rất to và khỏe, rễ nhiều.

Khi tăng nồng độ chitosan từ 0 đến 30 mg/L, chỉ số tăng trưởng của mẫu cấy cũng tăng theo. Chỉ số tăng trưởng đạt cao nhất ở nghiệm thức bổ sung chitosan 30 mg/L. Chitosan được nhận thấy là một chất kích thích sinh trưởng hiệu quả trong vi nhân giống các loài lan. Việc sử dụng chitosan nhận được nhiều sự quan tâm vì hợp chất này rẻ, an toàn với con người và môi trường [16]. Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy tác động tích cực của chitosan trong quá trình vi nhân giống các loài lan. Uthairatanakij cho rằng, chitosan có thể tạo ra tín hiệu tổng hợp hormone thực vật như gibberellin, thúc đẩy sự tăng trưởng và phát triển của mẫu cấy [17]. Tantasawat nhận thấy, chitosan 50 mg/L chitosan thúc đẩy mạnh sự tăng trưởng của cây con lan *Dendrobium* 'AW 179'. Số lượng chồi, lá và rễ của cây con tăng lần lượt 2,3; 3,6; 1,8 lần so với môi trường không bổ sung chitosan sau 12 tuần nuôi cấy [18]. Lê Hồng Giang và Nguyễn Bảo Toàn đã bổ sung chitosan với nồng độ 15 mg/l và 25 mg/l vào môi trường nuôi cấy lan Hồ điệp, giúp cải thiện đáng kể chiều cao và sự hình thành rễ mới của cây con sau 70 ngày nuôi cấy [6].

Khi tăng nồng độ chitosan cao hơn 30 mg/L, chỉ số tăng trưởng giảm xuống. Nồng độ chitosan quá cao có thể ức chế sự tăng trưởng của cây và gây chết tế bào. Pornpienpakdee đã nhận thấy, chitosan ở nồng độ cao (80 mg/L) đã ức chế sự tăng trưởng của PLBs lan *Dendrobium* 'Eiskul' [16]. Chitosan có đặc tính ưa nước, có thể hấp thụ các phân tử nước xung quanh nó hình thành một lớp màng hydrogel chitosan. Lớp màng này hoạt động như một chất cản đối với cây. Cây không thể hấp thụ nước, O_2, CO_2, ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng và phát triển [19]. Nồng độ chitosan phù hợp cần được khảo sát bằng thực nghiệm, ảnh hưởng của chitosan có thể khác nhau giữa các loài [20].

Tỉ lệ ra rễ trên các nghiệm thức bổ sung chitosan đều đạt 100%. Chiều dài rễ đạt cao nhất trên môi trường bổ sung chitosan 30 mg/L (5,36 mm). Khi tăng nồng độ chitosan lên cao hơn, chiều dài rễ giảm (Bảng 4). Acemi và cộng sự đã nghiên cứu ảnh hưởng của chitosan và các chất điều hoà sinh trưởng thực vật đến quá trình phát triển của cây *Ipomoea purpurea* (L.) Roth *in vitro*. Kết quả cho thấy, chitosan kích thích phát sinh chồi, kích thích quá trình tạo rễ, nhưng lại ngăn cản quá trình kéo dài rễ của cây. Nhóm tác giả này cũng nhận thấy, chitosan có hoạt tính gần giống cytokinin hơn là auxin [21]. Đây có thể là nguyên nhân ngăn rễ kéo dài khi tăng nồng độ chitosan bổ sung vào môi trường.

Về hình thái cây con, môi trường bổ sung chitosan 30 mg/L cho hình thái cây con tốt nhất. Cây con có lá to và khỏe; Rễ mập, có màu xanh đậm (Hình 4). Như vậy, chitosan 30 mg/L cho hiệu quả tốt trong quá trình vươn thân và ra rễ của lan kiều vuông.

Hình 4. *Cây lan kiều vuông sau 4 tuần nuôi cấy trên các môi trường bổ sung chitosan nồng độ khác nhau (thanh kích thước 1 cm)*
a) chitosan 0 mg/L; b) chitosan 10 mg/L; c) chitosan 20 mg/L; d) chitosan 30 mg/L; e) chitosan 40 mg/L; f) chitosan 50 mg/L; g) chitosan 60 mg/L

4. Kết luận

Nghiên cứu đã tìm được loại và các chất điều hòa sinh trưởng thực vật phù hợp cho các giai đoạn của quá trình vi nhân giống lan kiều vuông. Môi trường MS ½ bổ sung BA

1,5 mg/L, NAA 0,5 mg/L thích hợp cho sự tăng sinh PLBs. Chồi tái sinh từ PLBs tốt nhất trên môi trường MS ½ bổ sung BA 0,5 mg/L và NAA 0,5 mg/L. Môi trường MS ½ bổ sung BA 1,0 mg/L, NAA 0,5 mg/L thích hợp cho sự sinh trưởng của cụm chồi lan kiều vuông.

Môi trường bổ sung chuối 60 g/L giúp cây vươn thân và ra rễ tốt. Chitosan ở nồng độ 30 mg/L cũng được nhận thấy có tác dụng tích cực lên quá trình tạo cây con hoàn chỉnh lan kiều vuông.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Phan Thu Thủy, "Lan kiều vuông: Đặc điểm, cách trồng và chăm sóc Kiều Vuông nở hoa đẹp", *camnangnuoitrong.com*, 2020, [Online] camnangnuoitrong.com/lan-kieu-vuong, 10.09.2021

[2] Bhojwani S.S, Dantu P.K., *Plant tissue culture: an introductory text*, Springer, India, 2013.

[3] Nicomrat D., Anantasaran J.. "A Reliable Homemade Tissue Culture Protocol for *Dendrobium* Orchid Cultivation", *Applied Mechanics and Materials*, vol 804, 2015, pp. 227 – 230.

[4] Majumder M, Maiti S. S, Banerjee N., "Direct and Callus-mediated Protocorm-like Body Induction and High Frequency Adventitious Shoot Regeneration in an Endangered Orchid – *Dendrobium farmeri* Paxt. (Orchidaceae)", *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, vol 4, 2010, pp. 22- 28.

[5] Teixeira da Silva J.A., Cardoso J.C., Dobraszki J, Zeng S., "*Dendrobium* micropropagation: a review", *Plant Cell Rep*, vol 34, 2015, pp. 671–704.

[6] Lê Hồng Giang, Nguyễn Bảo Toàn, "Hiệu quả của chitosan lên sự sinh trưởng của cụm chồi và cây con lan hồ điệp (*Phalaenopsis* sp.) *in vitro"*. *Tạp chí Khoa học*, số 24 a, 2012, trang 88-95.

[7] Tantasawat P., Wannajindaporn A., Chantawaree C., Wangpunga C., Poomsom K., Sorntip A., "Chitosan stimulates growth of micropropagated *Dendrobium* plantlets", *Acta horticulturae*, vol 878, 2010, pp. 205-212.

[8] Murashige T., Skoog F., "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures". *Physiologia Plantarum*, vol 15 (3), 1962, pp. 473–497.

[9] Mai Thị Phương Hoa, Đỗ Tiến Vinh, "Nuôi cấy protocorm lan thạch hộc thiết bì (*Dendrobium officinale* Kimura *et* Migo) *in vitro"*, *Tạp chí Khoa học & Công nghệ*, số 3, 2018, trang 52-58.

[10] Khatun H, Khatun M.M., Biswas M.S., Kabir M.R., Al-Amin M., "*In vitro* growth and development of *Dendrobium* Hybrid orchid". *Bangladesh J. Agril. Res*, vol 35(3), 2010, pp. 507-514.

[11] Đặng Thị Thắm, H'Yon Niê Bing, Nguyễn Thị Thanh Hằng, Đinh Văn Khiêm, Nông Văn Duy, Trần Thái Vinh, Quách Văn Hợi, Vũ Kim Công, "Vi nhân giống lan nhất điểm hoàng (*Dendrobium heterocarpum* Lindl.)", *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, số 16 (1), 2018, trang 127-135.

[12] Lê Thị Diễm, Võ Thị Bạch Mai, "Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự nhân nhanh chồi *in vitro* lan Thạch hộc thiết bì (*Dendrobium officinale* Kimura *et* Migo)", *Tạp chí Phát triển KH & CN*, tập 20 – số T2, 2017, trang 29 – 38.

[13] Nguyễn Đức Lượng, Lê Thị Thủy Tiên, *Công nghệ tế bào*, Nhà xuất bản Đại học quốc gia TPHCM, 2016.

[14] Aktar S.A., Nasiruddin K. M., Hossain K, "Effects of different media and organic additives interaction on *in vitro* regeneration of *Dendrobium* orchid", *Journal of Agriculture & Rural Development*, vol 6 (1), 2008, pp. 69-74.

[15] Lee Y., Chee – Tak E., *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses – Methods and Protocols*, Springer Protocols Handbooks, 2018.

[16] Pornpienpakdee P., Singhasurasak R., Chaiyasap P., Pichyangkura R., Bunjongrat R., Chadchawan S., & Limpanavech P., "Improving the micropropagation efficiency of hybrid *Dendrobium* orchids with chitosan", *Scientia Horticulturae*, vol 124, 2010, pp. 490–499.

[17] Uthairatanakij A., Teixeira da Silva J.A., Obsuwan K., "Chitosan for Improving Orchid Production and Quality", *Orchid Science and Biotechnology*, vol 1(1), 2007, pp.1-5.

[18] Tantasawat P., Wannajindaporn A., Chantawaree C., Wangpunga C., Poomsom K., Sorntip A., "Chitosan stimulates growth of micro-propagated *Dendrobium* plantlets", *Acta Hortic*, vol 878, 2010, pp. 205–212.

[19] Restanto D.P., Santoso B., Kriswanto B., Supardjono S., "The application of chitosan for protocorm like bodies (PLB) induction of orchid (*Dendrobium* sp) *in vitro*", *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, vol 9, 2016, pp. 462 – 468.

[20] Acemi A., "Chitosan versus plant growth regulators: a comparative analysis of their effects on *in vitro* development of *Serapias vomeracea* (Burm.f.) Briq., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol 141, 2020, pp. 327 – 338.

[21] Acemi A., Bayrak B., Çakır M., Demiryürek E., Gün E., Gueddari N.E.E., Özen F., "Comparative analysis of the effects of chitosan and common plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Ipomoea purpurea* (L.) Roth from nodal explants", *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, vol 54, 2018, pp. 537 – 544.