

## NHÂN GIỐNG *IN VITRO* LOÀI LAN BẠCH HẠC *DENDROBIUM WATTII* TỪ NUÔI CẤY ĐỈNH SINH TRƯỞNG

Trần Thị Ngọc Lan\*

### Tóm tắt

Nghiên cứu nhân giống *in vitro* lan Bạch hạc nhằm bảo tồn và phát triển giống lan quý này. Kết quả cho thấy protocorm-like body (PLB) hình thành từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng trên môi trường  $\frac{1}{2}$  Murashige and Skoog (1962,  $\frac{1}{2}$  MS) bổ sung NAA sau 42 ngày nuôi cấy. Các PLB được hình thành khi nuôi cấy các lát mỏng tế bào theo chiều dọc (ITCL) của PLB trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l NAA và 0,5mg/l BA. PLB được nhân lên với hệ số 13,15 PLB/PLB ban đầu khi chúng được cấy chuyển quăng 56 ngày trên môi trường MS bổ sung 20 g/l sucrose, 1 mg/l NAA, 0,5 mg/l BA, 0,5 mg/l than hoạt tính (AC), 2 g/l peptone và 8 g/l agar. Các PLB hình thành cây và phát triển tốt trên môi trường  $\frac{1}{2}$  MS bổ sung 0,5 mg/l NAA, 0,5 mg/l BA, 10 g/l sucrose, 10% nước dừa (v/v), 0,5 g/l AC và 8 g/l agar sau 90 ngày nuôi cấy. Không có sự thay đổi nào về hình thái ghi nhận được ở các cây này qua con đường nhân giống tạo PLB từ đỉnh sinh trưởng.

**Từ khóa:** 6-Benzylaminopurine (BA), *Dendrobium wattii*, đỉnh sinh trưởng, lớp mỏng tế bào,  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA), peptone, PLB.

### 1. Giới thiệu

Chi Lan đa thân *Dendrobium* có khoảng 1.400 loài trên thế giới, chủ yếu phân bố ở Đông Nam Á. Ở Việt Nam có 107 loài, phân bố ở các vùng núi và một số đảo ven biển [5]. Trong đó, loài lan Bạch hạc (*Dendrobium wattii*, định danh bởi Heinrich Gustav Reichenbach, 1888, trong Orchids wiki) cho hoa bền, đẹp thanh nhã với hương thơm dễ chịu đang ngày bị khai thác cạn kiệt. Để bảo tồn và phát triển loài lan quý hiếm này, phương thức nhân giống qua con đường nuôi cấy đỉnh sinh trưởng là khả thi.

Ở nước ta, nghiên cứu nhân giống và nuôi trồng chi lan *Dendrobium* chủ yếu với các giống lan lai nhập nội nhằm sản xuất hoa cắt cành hay trồng chậu làm cây cảnh. Quá trình nhân giống thường bằng hạt như Nguyễn Văn Song và cs. (2011)

gieo hạt lan Kim điệp (*Dendrobium chrysotosum* Lindl.) trên môi trường MS bổ sung 20 g/l sucrose, 8 g/l agar, 15% nước dừa và 2 mg/l BA. Nguyễn Thị Sơn và cs. (2014) nhân giống lan Thạch斛 thiết bì (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) bằng phương pháp gieo hạt trên môi trường VW bổ sung 10 g/l sucrose, 6 g/l agar, 10 % nước dừa và nhân giống vô tính thông qua việc sử dụng đoạn thân mang 2 mắt ngủ từ cây gieo hạt *in vitro*, nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 20g/l sucrose, 10% nước dừa, 0,5 mg/l BA, 0,5mg/l NAA, 6g/l agar. Sunitibala và Kishor (2009) nhân giống *Dendrobium transparent* L. bằng nuôi cấy đoạn thân mang mắt ngủ từ cây gieo hạt *in vitro* trên môi trường  $\frac{1}{2}$  MS bổ sung 1 mg/l NAA và 2 mg/l BA. Tuy nhiên, việc nhân giống loài lan rừng Bạch hạc bằng phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng chưa được đề cập đến. Chính vì vậy, mục đích của nghiên cứu là nhân nhanh lan

\* TS, Trường CĐ Kinh tế - Kỹ thuật Lâm Đồng

Bạch hạc bằng phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, tạo PLB để nhân nhanh và bảo tồn giống cây quý này.

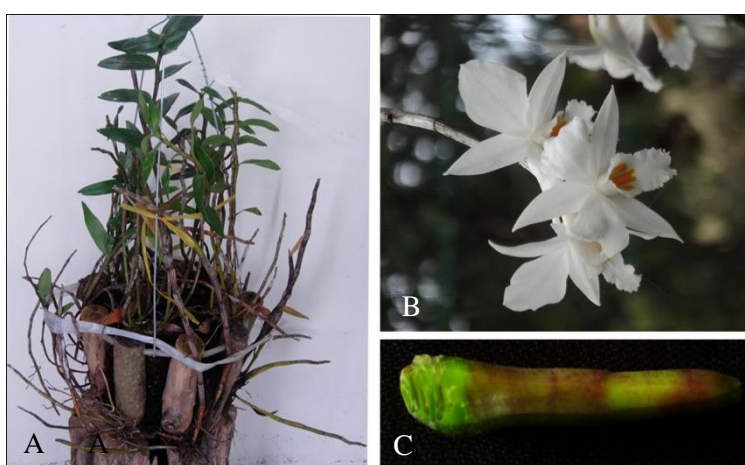
## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu được đưa vào nuôi cấy mô là chồi mầm của những cây lan rừng thuộc loài lan Bạch hạc (*Dendrobium wattii*, Hình 1A., 1B.) tại rừng Bi Đúp, cao nguyên Langbian, Đà Lạt. Sử dụng chồi bên làm vật liệu để nuôi cấy đỉnh sinh trưởng (Hình

1C.).

Môi trường nuôi cấy: Sử dụng môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) và ½ MS. Tùy thuộc từng thí nghiệm sẽ bổ sung hay không bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (CDHSTTV) khác nhau (NAA, BA). pH của các môi trường nuôi cấy: 5,3. Các môi trường nuôi cấy được cho vào các bình thủy tinh (thể tích bình: 250 ml với 40 ml/bình) và được hấp khử trùng trong 20 phút ở 121°C, 1 atm.



**Hình 1.** Cây lan Bạch hạc.

A. Chậu cây lan Bạch hạc; B, C. Đoạn thân mang hoa và chồi cây lan Bạch hạc.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng lan Bạch hạc

Các chồi bên có chiều dài 2 - 3 cm được rửa sạch dưới vòi nước đang chảy, rửa lại bằng dung dịch nước rửa chén Sunlight, rửa lại nhiều lần bằng vòi nước 15 phút, rửa bằng nước cất đã hấp khử trùng (NC), khử trùng bằng cồn ethylic 75% (v/v) trong 30 giây, rửa NC 3 lần, ngâm trong dung dịch HgCl<sub>2</sub> 0,1% 6 phút, rửa lại 3 lần bằng NC. Sau đó, tách bỏ các lá bao, cho đến khi lộ ra đỉnh chồi mang hai đến ba lá sơ khởi (đường kính 1 -2 mm), rửa sạch bằng NC và cấy vào môi trường ½ MS bổ sung 20 g/l sucrose, 10% nước dừa (v/v), các nồng độ NAA (0, 0,5 và

1mg/l), 0,5 mg/l AC và 8 g/l agar với 1 chồi/bình. Mỗi nghiệm thức gồm 4 bình. Các chồi này được nuôi trong 42 ngày để khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự hình thành PLB.

#### 2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của NAA và BA lên khả năng hình thành PLB từ các ITCL của PLB có nguồn gốc từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Các PLB hình thành từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng được tiến hành nhân lên với việc cắt thành các lớp mỏng tế bào theo chiều dọc của PLB (longitudinal thin cell layer - ITCL, chiều dày lớp: 0,5 mm) và nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 20 g/l sucrose, 10% nước dừa (v/v), các nồng độ NAA (0, 1 mg/l) riêng lẻ hay kết hợp với

BA (0, 0,5, 1 mg/l), 0,5 g/l AC và 8 g/l agar với 10 mẫu/bình. Mỗi nghiệm thức gồm 5 bình. Các chồi này được nuôi trong 56 ngày để khảo sát ảnh hưởng của NAA và BA lên sự hình thành PLB thứ cấp.

### 2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nước dừa và peptone lên khả năng nhân lên của các PLB thứ cấp

Các PLB thu được từ thí nghiệm trên được nuôi cấy trên môi trường MS chứa 1 mg/l NAA, 0,5 mg/l BA, 20 g/l sucrose, 0,5 g/l AC và 8 g/l agar được xem là môi trường cơ bản, bổ sung hay không bổ sung 10% nước dừa (v/v), 2 g/l peptone (riêng lẻ hay kết hợp) để khảo sát ảnh hưởng của các chất dinh dưỡng hữu cơ này lên khả năng nhân lên của PLB. Nuôi cấy với 10 mẫu/bình. Mỗi nghiệm thức gồm 5 bình. Xác định số PLB/mẫu PLB ban đầu và khối lượng trung bình của 1 PLB sau 56 ngày nuôi cấy.

### 2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của CDHSTTV lên khả năng hình thành cây con từ PLB

Các PLB có khối lượng trung bình từ 37,13 – 42,21 mg thu được ở thí nghiệm trên được nuôi cấy trên môi trường ½ MS bổ sung NAA (0, 0,5 mg/l) riêng lẻ hay kết hợp với BA (0, 0,5 mg/l), 10 g/l sucrose, 10% nước dừa (v/v), 1 g/l AC và 8 g/l agar với 10 mẫu/bình. Mỗi nghiệm thức gồm 5 bình. Xác định tỷ lệ hình thành chồi, hình thành rễ và khả năng sinh trưởng của những cây này sau 90 ngày nuôi cấy.

### 2.2.5. Điều kiện nuôi cấy

Nhiệt độ phòng nuôi là  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , cường độ ánh sáng: 2000 lux, số giờ chiếu sáng: 12 giờ/ngày và độ ẩm không khí: 70%.

### Chỉ tiêu theo dõi

Quan sát màu sắc, tỷ lệ hình thành PLB. Sử dụng kính hiển vi soi nổi (Nikon SMZ800, Nhật) để quan sát và chụp hình trực tiếp dưới kính hiển vi soi nổi các PLB

hình thành từ đỉnh sinh trưởng ở độ phóng đại 10 - 45 lần.

Xác định khối lượng của PLB bằng cân phân tích Sartorius.. Khối lượng trung bình của 1 PLB được xác định bằng tổng khối lượng của các PLB/tổng số PLB. Đo chiều dài chồi và chiều dài rễ của cây bằng thước cặp đo Insize 2002S. Tỷ lệ hình thành chồi hay rễ: số mẫu hình thành chồi hay rễ x 100 trên tổng số mẫu nuôi cấy. Số rễ hình thành trung bình/cây con: tổng số rễ/tổng số cây hình thành rễ.

### 2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm trên được lặp lại 3 lần. Các số liệu thu được là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Số liệu được phân tích thống kê bằng phép thử Duncan (sự khác biệt có ý nghĩa ở mức xác suất  $P < 0,05$ ) với phần mềm xử lý thống kê SPSS (Statistical Program Scientific System) 16.0.

## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Ảnh hưởng của NAA lên khả năng sống sót và phát triển của đỉnh sinh trưởng lan Bạch hạc

Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng nhằm tạo PLB, vật liệu khởi đầu trong nhân giống lan. Kết quả được trình bày qua bảng 1.

Đỉnh sinh trưởng của lan Bạch hạc là một khối màu trắng, hình tam giác có thể mang từ 1 đến 3 – 4 phác thể lá (Hình 2A.). Sau 30 ngày nuôi cấy, PLB được hình thành từ các mẫu cây đỉnh sinh trưởng (Hình 2B, 2C.). Từ bảng 1 cho thấy, tỷ lệ sống sót, tỷ lệ hình thành PLB, số PLB/mẫu cũng như khối lượng trung bình của 1 PLB hình thành đạt cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 1 mg/l NAA (tương ứng lần lượt 83,33%, 83,33%, 3,25 PLB/mẫu và 40,50 mg). Ở nghiệm thức không bổ sung CDHSTTV, tỷ lệ sống sót của mẫu cũng đạt 75% nhưng tỷ lệ hình thành PLB cũng như số PLB/mẫu, khối lượng trung bình

của 1 PLB không cao (trung ứng 50%, 1,5 PLB/mẫu và 34,40 mg). NAA là chất điều hòa sinh trưởng thực vật có khả năng kích thích phân chia và kéo dài tế bào. Sử dụng NAA làm khối đỉnh sinh trưởng phát triển

và duy trì tiềm năng sống sót của mình. Vì vậy, nghiệm thức bổ sung 1 mg/l NAA là phù hợp trong việc hình thành PLB khi nuôi cấy đỉnh sinh trưởng lan Bạch hạc.

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của NAA lên khả năng sống sót và phát triển của đỉnh sinh trưởng lan Bạch hạc sau 42 ngày nuôi cấy

Nồng độ NAA (mg/l)	Tỷ lệ sống sót (%)	Tỷ lệ tạo PLB (%)	Số PLB/mẫu	Khối lượng của 1 PLB TB (mg)
0	75,00b*	50,00b	1,50c	34,40b
0,5	75,00b	58,33b	2,33b	35,20b
1	83,33a	83,33a	3,25a	40,50a

\*: Các mẫu tự khác nhau (a,b,...) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với  $P < 0,05$  bằng phép thử Duncan.

Có thể nói rằng, đỉnh sinh trưởng là bộ phận đặc biệt nhất của cây, không chỉ được che chắn bởi những sơ khởi lá mà tại vị trí này, hệ thống mạch chưa liên kết tới, do đó, thường không bị xâm nhiễm bởi virus vốn đi vào cây thông qua hệ thống này. Hơn nữa, sự di chuyển của virus không theo kịp với tốc độ phân chia tế bào ở vùng mô phân sinh ngọn (Dương Công Kiên, 2006; Morel, 1960). Kỹ thuật này cho phép nhân giống hữu hiệu vì bộ phận đỉnh sinh trưởng còn ở giai đoạn non nên quá trình phân chia và phân hóa diễn ra mạnh. Nuôi cấy mô phân sinh ngọn lan sẽ hình thành các protocorm. Từ protocorm với các điểm sinh trưởng bất định có thể được nhân

lên để thành các PLB. Không như trong nuôi cấy mô sẹo *in vitro* của những loài thực vật khác, việc thiết lập gen của protocorm được xác định chính xác ngay từ protocorm hình thành ban đầu khi nuôi cấy đỉnh sinh trưởng (Morel, 1960, 1964; Neumann và cs., 2009).

### 3.2. Ảnh hưởng của NAA và BA lên khả năng hình thành PLB thứ cấp từ ITCL của PLB có nguồn gốc từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng lan Bạch hạc

Với mục đích tạo PLB thứ cấp để nhân giống nhanh lan Bạch hạc với mẫu cảm ứng là PLB. Kết quả nhận được thể hiện qua bảng 2.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của NAA và BA lên khả năng hình thành PLB từ ITCL của PLB có nguồn gốc từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng lan Bạch hạc sau 56 ngày nuôi cấy.

NAA	BA	Tỷ lệ sống sót và tạo PLB (%)	Số PLB/mẫu	Hình thái PLB
0	0	92,67ab*	2,01c	Nhỏ, xanh đậm
1	0	94,00ab	4,17b	To, xanh đậm
0	0,5	85,33b	2,45c	Nhỏ, xanh
0	1	93,33ab	2,33c	Nhỏ, xanh
1	0,5	100,00a	7,67a	To, xanh đậm
1	1	73,33c	2,04c	Nhỏ, xanh đậm

\*: Các mẫu tự khác nhau (a,b,...) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với  $P < 0,05$  bằng phép thử Duncan.

Với mẫu cây là các ITCL cho thấy có sự đáp ứng của các tế bào vùng mô phân sinh ngọn với CĐHSTTV do các ITCL với kích thước mỏng sẽ tạo ưu thế cho việc cảm ứng của CĐHSTTV lên mẫu cây dễ dàng hơn so với những mẫu dày. Các kết quả này cũng phù hợp với các kết quả trên đối tượng *Cymbidium Twilight Moon* “Day Light” (Teixeira da Silva và Tanaka, 2006).

Việc bổ sung NAA và BA với nước dừa tỏ ra hiệu quả trong việc hình thành các PLB thứ cấp. Nước dừa chứa nhiều chất khoáng, vitamine ... là những chất góp phần hỗ trợ sự sinh trưởng và phát triển của mô thực vật, đặc biệt là các cây họ Lan (Orchidaceae) (Neumann và cs., 2009). Sử dụng BA riêng lẻ ít có tác dụng nhưng sự kết hợp BA và NAA làm tăng khả năng phân bào của mẫu cây. Từ bảng 2 cho thấy,

tại nồng độ 1 mg/l NAA và 0,5 mg/l BA cho tỷ lệ sống sót và hình thành PLB cũng như số PLB là cao hơn cả (tương ứng lần lượt 100%, 7,67 PLB/mẫu). So sánh với việc nhân PLB (hệ số nhân 4,2 lần khi nhân protocorm từ việc gieo hạt lan Thạch hộc) [2] thì nghiên cứu ở đây đạt số lượng cao hơn. Vì vậy, nghiệm thức môi trường nuôi cấy bổ sung 1 mg/l NAA và 0,5 mg/l BA là phù hợp để hình thành các PLB thứ cấp bằng phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào.

### 3.3. Ảnh hưởng của nước dừa và peptone lên khả năng nhân lên của PLB lan Bạch hạc

Với mục đích khảo sát ảnh hưởng của peptone và nước dừa lên khả năng nhân lên của PLB thứ cấp, kết quả nhận được thể hiện qua bảng 3.

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của peptone và nước dừa lên khả năng nhân lên của PLB lan Bạch hạc sau 56 ngày nuôi cấy

Môi trường cơ bản bổ sung	Số PLB/PLB ban đầu	Khối lượng trung bình của 1 PLB (mg)
0	5,12c*	25,65c
10% nước dừa (v/v)	10,67b	37,13b
2 g/l peptone	13,15a	41,56a
10% nước dừa (v/v) và 2 g/l peptone	13,56a	42,21a

\*: Các mẫu tự khác nhau (a,b,...) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với  $P < 0,05$  bằng phép thử Duncan.

Nước dừa cùng với peptone là những chất cần thiết trong nuôi cấy các loài lan. Peptone chứa hầu như đầy đủ các acid amin cần thiết trong giai đoạn nhân lên của PLB (Parisa và cs., 2014). Ở nồng độ 10% (v/v) nước dừa, số PLB/PLB ban đầu và khối lượng trung bình của 1 PLB không cao (10,67 và 37,13 mg). Ở nồng độ 2 g/l peptone là hữu hiệu trong sự nhân lên của PLB với số PLB/PLB ban đầu và khối lượng trung bình của 1 PLB là cao hơn (13,15 và 41,56 mg). Ở nồng độ 2 g/l

peptone kết hợp với 10% nước dừa, số PLB/PLB ban đầu và khối lượng trung bình của 1 PLB cũng không khả quan hơn (13,56 và 42,21 mg). Vì vậy, chọn nghiệm thức môi trường cơ bản bổ sung 2 g/l peptone để nhân các PLB từ PLB.

### 3.4. Ảnh hưởng của CĐHSTTV lên khả năng hình thành cây con từ PLB cây Bạch hạc

Các PLB hình thành từ các thí nghiệm trên được nuôi cấy tiếp tục trên môi trường ½ MS bổ sung NAA và BA để khảo

sát ảnh hưởng của CDHSTTV lên khả năng hình thành cây con từ PLB, kết quả nhận được theo bảng 4.

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của CDHSTTV lên khả năng hình thành cây con từ PLB lan Bạch hạc sau 90 ngày nuôi cấy.

Nồng độ CDHSTTV (mg/l)		Tỷ lệ hình thành chồi (%)	Chiều dài chồi TB/cây (cm)	Tỷ lệ hình thành rễ (%)	Số rễ TB/cây	Chiều dài rễ TB/cây (cm)
NAA	BA					
0	0	49,33c*	1,26c	34,67	1,25c	0,50b
0,5	0	62,67b	2,45b	44,67b	2,58b	0,61b
0	0,5	22,67d	1,17c	10,67d	1,12c	0,11c
0,5	0,5	100,00a	4,63a	85,33a	3,62a	1,54a

\*: Các mẫu tự khác nhau (a,b,...) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với  $P < 0,05$  bằng phép thử Duncan.

Từ kết quả ở bảng 4 cho thấy, tại nghiệm thức không bổ sung CDHSTTV, các PLB vẫn hình thành chồi và rễ với tỷ lệ tương ứng (49,33% và 34,67%). Điều này nói lên khả năng tự phát triển theo các giai đoạn của PLB. Tại nghiệm thức bổ sung NAA hay BA đều làm giảm tỷ lệ hình thành chồi và rễ, đặc biệt là khi chỉ bổ sung BA. Cytokinin như BA thường làm giảm sự sinh trưởng của chồi ngọn, làm tăng sự phân cành, do đó, làm giảm chiều cao chồi cũng như khả năng hình thành rễ. Nghiệm thức tốt nhất cho sự hình thành chồi, rễ để tạo cây con từ PLB khi bổ sung 0,5 mg/l NAA và 0,5 mg/l BA vào môi trường nuôi cấy cho tỷ lệ hình thành chồi là 100% và tỷ lệ hình thành rễ là 85,33% với sự sinh trưởng của chồi và rễ là cao hơn cả. BA phối hợp với NAA làm tăng khả năng phân chia tế bào, kích thích sự khởi tạo cơ quan, cụ thể là cây con (Hình 2F, 2G.). Nuôi cấy tiếp tục ở nghiệm thức này, 100% cây con ra rễ và phát triển bình thường.

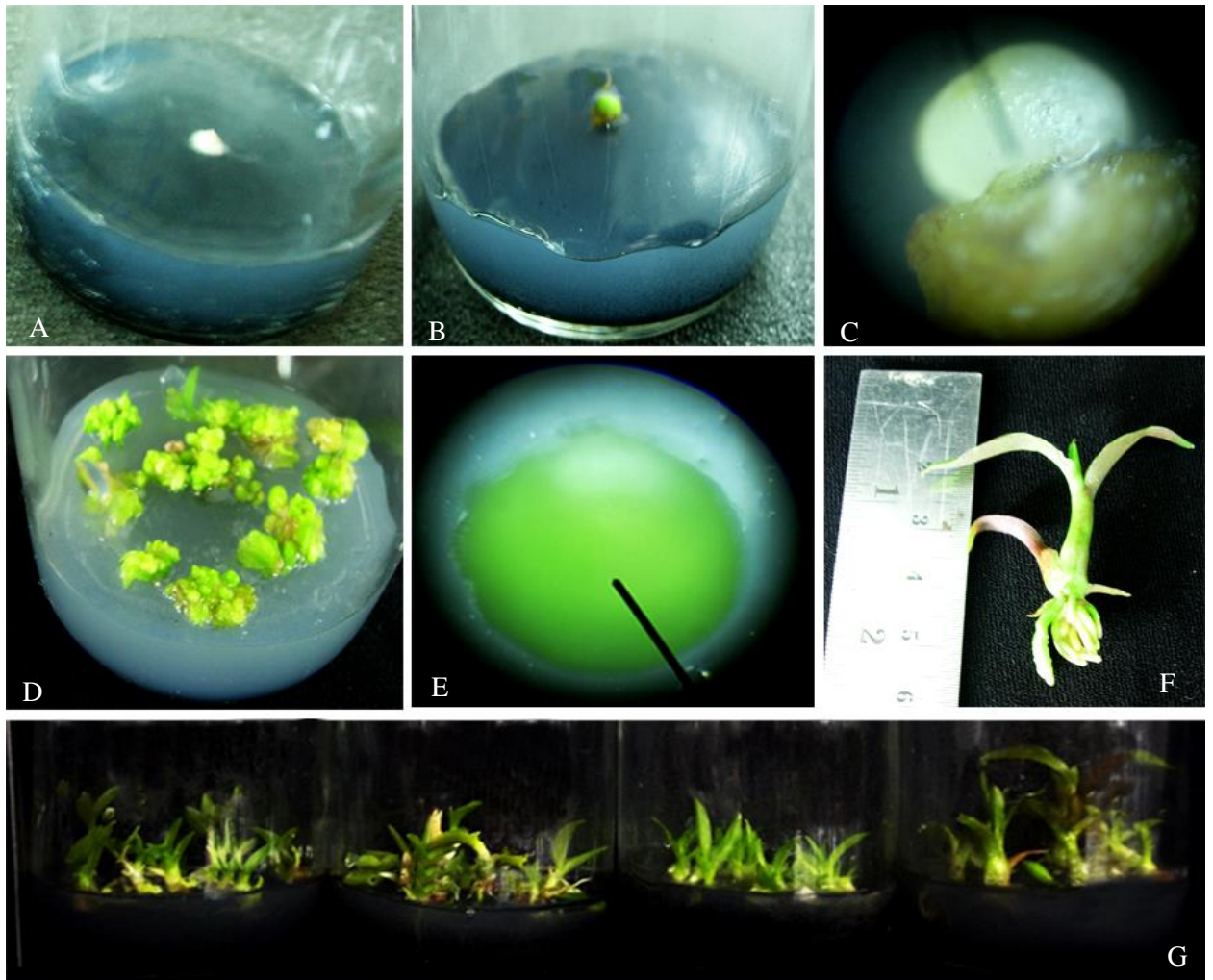
Qua khảo sát cho thấy, không có sự thay đổi nào về hình thái ghi nhận được ở

các cây này qua con đường nhân giống PLB từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng.

#### 4. Kết luận

Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng cây Bạch hạc đạt tỷ lệ sống sót và hình thành PLB (83,33%) trên môi trường ½ MS bổ sung 20 g/l sucrose, 10% nước dừa (v/v), 1 mg/l NAA, 0,5 g/l AC và 8 g/l agar. Sự hình thành PLB từ các ITCL của PLB trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l NAA và 0,5 mg/l BA. Các PLB này tiếp tục nhân lên trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l NAA và 0,5 mg/l BA, 20 g/l sucrose, 0,5 mg/l AC, 2 g/l peptone và 8 g/l agar với số PLB/PLB ban đầu: 13,15 sau 56 ngày nuôi cấy. Các PLB hình thành biệt hóa 100% thành chồi, rễ và phát triển tốt nhất trên môi trường ½ MS bổ sung 0,5 mg/l NAA, 0,5 mg/l BA, 10 g/l sucrose, 10% nước dừa (v/v), 0,5 g/l AC và 8 g/l agar.

Như vậy, bằng phương thức hình thành PLB từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng và qua con đường nhân PLB để tái sinh cây là phương thức nhân giống nhanh và hữu hiệu đối với loài lan Bạch hạc.



**Hình 2.** Nhân giống lan Bạch hạc.

- A. Đỉnh sinh trưởng ở ngày nuôi cấy thứ 0.  
 B. Sự hình thành PLB từ đỉnh sinh trưởng ở ngày nuôi cấy thứ 30.  
 C. Mẫu đỉnh sinh trưởng phát sinh PLB dưới kính hiển vi soi nổi.  
 D. Sự hình thành PLB thứ cấp từ các ITCL của PLB nguồn gốc từ đỉnh sinh trưởng.  
 E. 1 PLB dưới kính hiển vi soi nổi.  
 F. Cây con Bạch hạc hình thành từ PLB.  
 G. Sự sinh trưởng của cây con hình thành từ PLB của lan Bạch hạc (từ trái sang phải: môi trường nuôi cấy không bổ sung CĐHSTTV; bổ sung 0,5 mg/l NAA; bổ sung 0,5 mg/l BA và bổ sung 0,5 mg/l NAA, 0,5 mg/l BA) □

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Dương Công Kiên (2006), *Nuôi cấy mô thực vật*, tập 3, Tủ sách Đại học Khoa học Tự nhiên TP HCM.  
 [2] Vũ Ngọc Lan, Nguyễn Thị Lý Anh (2013), Nhân giống *in vitro* loài lan bản địa (*Dendrobium nobile* Lindl.), *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 11(7), 917-925.

- [3] Nguyễn Văn Song (2011), Nhân nhanh *in vitro* lan Kim Điệp (*Dendrobium chrysotoxum*) - một loài lan rừng có nguy cơ tuyệt chủng, *Tạp chí khoa học ĐH Huế*, 64:127-136.
- [4] Nguyễn Thị Sơn, Từ Bích Thủy, Đặng Thị Nhân, Nguyễn Thị Lý Anh, Hoàng Thị Nga and Nguyễn Quang Thạch (2014), Nhân giống *in vitro* lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (Thạch học thiết bì), *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 12(8), 1274-1282.
- [5] Đào Thị Thanh Vân, Đặng Thị Tô Nga (2008), *Giáo trình hoa lan*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
- [6] Morel G.M. (1960), Producing virus – free *Cymbidium*, *American Orchid Society Bulletin* 29, 495- 497.
- [7] Morel G.M.(1964), Tissue culture –A new means of clonal propagation of orchids, *American Orchid Society Bulletin* 33, 473-478.
- [8] Neumann N.H., Kumar A. and Imani J. (2009), *Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, pp. 75-134.
- [9] Parisa S., Mohsen K., Shirin D., Masoud M. (2014), Coconut water and peptone improve seed germination and protocorm like body formation of hybrid *Phalaenopsis*. *Agriculture Science Developments* 3(10), 317-322.
- [10] Sunitibala H. and Kishor R. (2009), Micropropagation of *Dendrobium transparent* L. from axenic pseudobulb segments, *Indian Journal of Biotechnology* 8, 448-452.
- [11] Teixeira da Silva J.A., and Tanaka M. (2006), Multiple Regeneration Pathways via thin cell layers in hybrid *Cymbidium*(Orchidaceae), *Journal of Plant Growth Regulation* 25(3), 203-210.

Tài liệu Internet

- [12] *Dendrobium wattii* - Orchids wiki - Wikia

## Abstract

### **Micropropagation *in vitro* *Dendrobium wattii* originated from apical meristem culture**

*Studies on micropropagation of Dendrobium wattii were conducted in order to conserve and develop this precious orchid species. The results showed that PLBs were formed from apical meristem culture on the ½ MS medium supplemented with NAA within 42 days. PLB longitudinal thin cell layer culture was used as a technique for PLBs micropropagation on MS medium containing 1 mg/l NAA and 0.5 mg/l BA were optimal for PLB formation. PLBs multiplied with 13.15 PLBs/initial PLB increase when they were subcultured once 56 days on the MS medium supplemented with 2 g/l peptone, 20 g/l sucrose, 1mg/l NAA, 0.5 mg/l BA, 0.5 g/l activated coal (AC) and 8 g/l agar. PLBs converted into normal plants with well-developed shoots and roots on the ½ MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA, 0.5 mg/l BA, 10 g/l sucrose, 10% coconut water (v/v), 0.5g/l AC, and 8 g/l agar after about 90 days. No abnormal morphological changes were found in Dendrobium seedlings with using this propagation methods.*

**Keywords:** *Apical meristem, 6-Benzylaminopurine (BA), Dendrobium wattii, longitudinal thin cell layer, α-naphthaleneacetic acid (NAA), peptone, PLB.*