

RESEARCH ON SOME CONDITIONS FOR CULTURING AND CARING FOR *Dendrobium parishii* IN VITRO

Vu Thanh Sac, Nguyen Thi Hai Yen*

TNU - University of Sciences

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 02/10/2022	<i>Dendrobium</i> is a genus of orchids with the second largest species diversity after the genus <i>Bulbophyllum</i> . However, their value are much greater than that of the Orchid. In the genus <i>Dendrobium</i> , there are many species that give beautiful and fragrant flowers. One of these species, Hoang Thao Tram (<i>Dendrobium parishii</i> Rchb. f. (Orchidaceae)) is a species with a high attractive aroma which were confirmed by scientific studies on extracting the essential oil. Currently, natural species <i>D. parishii</i> in the forest is being seriously degraded due to overexploitation and uncontrolled exploitation while the quantity of industrially produced seed has not been effectively exploited. The tissue of breeding to provide a source of plants for ornamental collection and essential oil extraction should be concerned. In this study, some conditions for <i>in vitro</i> culture and care of <i>D. parishii</i> seedlings at nursery stage were investigated. The study results showed that the suitable clean seed protocorm generation medium of <i>D. parishii</i> which was MS supplemented with BAP or kinetin 1.5 mg/l, the supplements included green banana, potato and carrot puree each. 40 g/l. The <i>in vitro</i> seedlings at the nursery stage are cared for in accordance with the following conditions: i) suitable <i>in vitro</i> seedling medium is coir; ii) planting density is 1 tree/pot; iii) Initial watering with tap water and using 60% sun net to cover the plants.
Revised: 30/01/2023	
Published: 30/01/2023	
KEYWORDS	
<i>Dendrobium parishii</i>	
<i>In vitro</i>	
Protocorm	
Planting material	
Plant nursery	

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY VÀ CHĂM SÓC CÂY GIAI ĐOẠN VƯỜN ƯƠM LAN HOÀNG THẢO TRÂM (*Dendrobium parishii*) IN VITRO

Vũ Thanh Sắc, Nguyễn Thị Hải Yến*

Trường Đại học Khoa học – ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 02/10/2022	<i>Dendrobium</i> (lan Hoàng thảo) là chi lan có độ đa dạng về loài lớn thứ hai sau chi lan Lọng (<i>Bulbophyllum</i>) nhưng có giá trị lớn hơn lan Lọng nhiều. Chi Hoàng thảo có rất nhiều loài cho hoa đẹp và có hương thơm. Hoàng thảo Trâm (lan Trâm - <i>Dendrobium parishii</i> Rchb. f. (Orchidaceae)) là một trong những loài có mùi thơm quyến rũ nhất. Vì vậy, đã có nhiều nghiên cứu được tiến hành để tìm hiểu, tách chiết tinh dầu của loại lan này. Hiện nay, Hoàng thảo rừng đang bị suy giảm nghiêm trọng do khai thác quá mức và không kiểm soát; trong khi đó, lượng con giống được sản xuất công nghiệp chưa đáp ứng được nhu cầu. Vấn đề nhân giống để cung cấp nguồn cây giống cho sưu tầm làm cảnh và chiết suất tinh dầu cần được quan tâm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát một số điều kiện nuôi cấy <i>in vitro</i> và chăm sóc cây con <i>D. parishii</i> ở giai đoạn vườn ươm. Kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường phát sinh protocorm từ hạt sạch phù hợp của <i>D. parishii</i> là MS bổ sung BAP hoặc kinetin 1,5 mg/l, các chất bổ sung gồm chuối xanh, khoai tây và cà rốt nghiền mỗi loại 40 g/l. Các điều kiện chăm sóc phù hợp với cây con <i>in vitro</i> ở giai đoạn vườn ươm bao gồm: giá thể trồng cây con <i>in vitro</i> phù hợp là xơ dừa; mật độ trồng là 1 cây/bầu; tưới ban đầu bằng nước máy 2 ngày/lần và sử dụng lưới 60% nắng để che cho cây.
Ngày hoàn thiện: 30/01/2023	
Ngày đăng: 30/01/2023	
TỪ KHÓA	
Hoàng thảo trâm	
<i>In vitro</i>	
Protocorm	
Giá thể	
Vườn ươm	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6579>

* Corresponding author. Email: yennth@tnu.edu.vn

1. Giới thiệu

Dendrobium là một chi lớn thứ hai trong họ Lan (Orchidaceae), đây cũng là một chi Lan có sự đa dạng nhất về hình thái. Theo trang Thực vật của thế giới trực tuyến (Plants of the World Online), hiện nay có 1.556 loài *Dendrobium* được phân loại, phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới như Sri Lanka, Ấn Độ, Trung Quốc, Nhật Bản, Malaysia, Australia và New Zealand [1]. Ở Việt Nam, chi này có 107 loài và 1 thứ, phân bố rải rác từ Bắc vào Nam, trên các vùng núi, một số đảo và vùng ven biển [2].

Các loài trong chi *Dendrobium* có hoa rất đẹp và được ưa chuộng, ngoài ra nhiều loài còn có giá trị dược liệu. Theo các tài liệu tham khảo được trích dẫn thu thập từ năm 1970 đến năm 2020 từ website Internet Kiến thức Quốc gia Trung Quốc (Web of Science, China National Knowledge Internet - CNKI), SciFinder, Google Scholar..., người ta đã phát hiện có 22 loài *Dendrobium* tại Trung quốc có công dụng trong điều trị các bệnh rối loạn da liễu và 131 hợp chất từ cây *Dendrobium* đã được báo cáo có các tác dụng chống viêm nhiễm, kháng khuẩn, chống oxy hóa, chống lão hóa, chống bệnh vẩy nến và ức chế tyrosinase. Các hợp chất có tính chất được học chính được tìm thấy trong các loài *Dendrobium* là phenanthrenes, alkaloids, favonoid, phenylpropanoids và lignans [3].

Dendrobium parishii (*Dendrobium parishii* Rchb. f. (Orchidaceae) - Hoàng thảo trầm) là một loài lan biểu sinh, được coi là loài đặc hữu của Thái Lan. Đây là loài lan rừng có mùi thơm rất đặc biệt, được Rchb.f. mô tả khoa học đầu tiên năm 1863. Hoàng thảo Trầm có nguồn gốc xuất xứ từ rất nhiều nơi và chiếm số lượng chủ yếu ở vùng Đông Nam Á, điển hình là Lào và Myama. Ở Việt Nam, *D. parishii* xuất hiện chủ yếu tại Điện Biên, đây là loài thuộc nhóm lan đa thân, thân mềm rủ xuống, thân này mầm từ gốc vào mùa xuân, hoa màu tím đậm, ra hoa vào mùa xuân - hạ trên các thân năm trước đã đứng ngọn và trút lá. Lá mọc dạng so le và cách nhau từ 1 – 3 cm, lá dài 8 – 10 cm và rộng khoảng 2,5 - 3 cm. Đây là loài lan rất đẹp và thơm, ngoài ra *D. parishii* còn được thu hái để sử dụng như nguồn dược liệu có tác dụng trong mỹ phẩm do chứa nhiều tinh dầu quý [4], [5]. Hiện nay, *D. parishii* trong rừng tự nhiên đang bị suy giảm số lượng nhanh chóng, có nguy cơ cạn kiệt và tuyệt chủng rất cao. Tình trạng khai thác quá mức đối với *D. parishii* nói riêng và lan rừng nói chung đang xảy ra không kiểm soát ở nhiều nơi. Hiện nay, tất cả các loài lan rừng Việt Nam đều có tên trong danh mục sách đỏ, cần được bảo vệ nghiêm ngặt [6]. Do đó, việc bảo tồn nguồn gen tự nhiên và nhân giống phục vụ nhu cầu con người là rất cần thiết. Trong điều kiện tự nhiên, các loài lan thường sinh sản thông qua vô tính bằng cách tạo chồi, tuy nhiên hệ số nhân giống thấp. Sinh sản hữu tính hiếm xảy ra bởi hạt lan khó nảy mầm trong tự nhiên vì không chứa nội nhũ, để nảy mầm được hạt lan phải cộng sinh với một số loại nấm phù hợp [7].

Công nghệ sinh học ngày càng phát triển, việc nhân giống *in vitro* tỏ ra có hiệu quả trong việc nhân nhanh và bảo tồn nhiều loài thực vật nói chung và các loài lan nói riêng. Trên thế giới đã có nhiều công bố về nhân giống các loài trong chi *Dendrobium*, điển hình là các loài Thạch斛 dùng làm thuốc (*D. candidum*, *D. officinale*) và một số loài lan rừng làm cảnh như *D. luteiflorum*, *D. primulinum*, *D. crumenatum*, *D. densiflorum* [8] và *D. chrysanthum* [9]. Ở Việt Nam, một số công bố được ghi nhận trong nhân giống một số loài như: *D. officinale* Kimura et Migo [10]; *D. luteiflorum* [11], *D. heterocarpum* Lindl [12]. Các nghiên cứu trên chủ yếu tiến hành trong quy mô phòng thí nghiệm, chưa cung cấp giống phục vụ thương mại hoặc bảo tồn. Trong phạm vi nghiên cứu này, một số điều kiện nuôi cấy *in vitro* và chăm sóc cây con giai đoạn vườn ươm loài lan Hoàng thảo Trầm (*Dendrobium parishii* Rchb. f. (Orchidaceae)) được tiến hành với mục tiêu tìm ra các điều kiện phù hợp trong nhân giống lan Hoàng thảo Trầm *in vitro* nhằm xây dựng quy trình nhân giống hoàn chỉnh để phục vụ bảo tồn và phát triển loài lan rừng quý hiếm này.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Quả của Hoàng thảo Trầm (*Dendrobium parishii*) có nguồn gốc từ huyện Mường Nhé - Điện Biên được thu sau 6 tháng kể từ khi cây có hoa (khoảng tháng 10 – 11). Quả sau khi thu thập được bảo quản trong điều kiện thoáng mát với nhiệt độ không quá 25°C hoặc lưu giữ trong ngăn mát của tủ lạnh, sử dụng trong khoảng 10 ngày.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Khử trùng tạo mẫu sạch bệnh đưa vào nuôi cấy

Sử dụng dung dịch xà phòng loãng để rửa bề mặt mẫu quả, sau đó đưa vào box cấy. Tiến hành khử trùng theo các bước: (1) lắc cồn 70% trong 30 giây; (2) lắc trong thủy ngân clorua 0,07% (HgCl_2) với thời gian từ 6 và 10 phút; (3) Tráng lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng.

2.2.2. Nghiên cứu sự phát sinh protocorm và tạo cây hoàn chỉnh

Quả sau khi khử trùng được tách lấy hạt và cấy lên môi trường tạo protocorm. Môi trường nuôi cấy sử dụng trong các thí nghiệm là MS có bổ sung đường, aga và một số chất cần thiết khác (kích thích sinh trưởng, chất bổ sung) theo từng mục đích thí nghiệm [13].

Nghiên cứu ảnh hưởng của BAP và kinetin đến khả năng phát sinh protocorm: Môi trường nuôi cấy sử dụng là MS + 20 g/l saccharose + 8,0 g/l agar + 1 g/l than hoạt tính (THT) bổ sung thêm BAP và kinetin với 4 công thức nồng độ 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l tương ứng với từng chất.

Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng chất hữu cơ bổ sung đến sự phát sinh protocorm

- Thí nghiệm 1: Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng chuối xanh nghiền đến sự phát sinh protocorm của mẫu nuôi cấy. Lấy kết quả tốt nhất từ thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của BAP và kinetin đến sự phát sinh protocorm, sau đó bổ sung chuối xanh nghiền với các hàm lượng khác nhau: CT1: 20 g/l; CT2: 30 g/l ; CT3: 40 g/l; CT4: 50 g/l.

- Thí nghiệm 2: Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng khoai tây nghiền đến phát sinh protocorm. Lấy kết quả tốt nhất từ thí nghiệm 1 bổ sung khoai tây nghiền với các hàm lượng khác nhau: CT1: 30 g/l; CT2: 40 g/l; CT3: 50 g/l.

- Thí nghiệm 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng cà rốt nghiền đến phát sinh protocorm. Lấy kết quả tốt nhất từ thí nghiệm 1 bổ sung cà rốt nghiền với các hàm lượng khác nhau: CT1: 30 g/l; CT2: 40 g/l; CT3: 50 g/l; CT4: 60 g/l.

Tạo cây hoàn chỉnh từ chồi phát sinh: Các chồi phát sinh từ protocorm được tách riêng lẻ và cấy lên môi trường MS bổ sung NAA với nồng độ 0,5 mg/l.

2.2.3. Ra cây ngoài vườn ươm và khảo sát các điều kiện chăm sóc cây con

Cây con sau nuôi cấy đạt đủ tiêu chuẩn (về chiều cao, số lá, số rễ) được đưa ra điều kiện ngoài phòng nuôi cấy (1 tuần). Sau đó lấy cây ra khỏi bình, rửa sạch rễ rồi trồng cây vào các giá thể thí nghiệm đã được xử lý với chất diệt nấm. Cây con được chăm sóc với các điều kiện khác nhau tùy thuộc mục đích thí nghiệm.

- Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của giá thể tới cây lan con *in vitro* trong giai đoạn vườn ươm: Các giá thể thí nghiệm được bố trí lần lượt là: dớn, xơ dừa, rêu, than củi, vỏ thông. Theo dõi sự sinh trưởng của cây con trong 30 ngày. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỉ lệ sống và trạng thái sinh trưởng của cây con.

- Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của mật độ cây đến sự sinh trưởng của cây lan *in vitro* trong giai đoạn vườn ươm: Cây con được bố trí trồng ra ngoài vườn ươm với các mật độ 1 cây/bầu; 2 cây/bầu; 3 cây/bầu; 4 cây/bầu. Theo dõi tỉ lệ sống và trạng thái sinh trưởng của cây con.

- Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của nước tưới đến cây lan con *in vitro* trong giai đoạn vườn ươm: Bố trí thí nghiệm tưới với dung dịch nước sạch và dung dịch MS với 4 công thức Nước máy; Nước máy + MS (tỷ lệ 2:1); Nước máy + MS (tỷ lệ 3:1); Nước máy + MS (tỷ lệ 4:1); Thí nghiệm tiến hành với cây trồng trên giá thể xơ dừa, với mật độ 1 cây/bầu. Theo dõi kết quả trong 30 ngày với các chỉ tiêu bao gồm tỉ lệ sống và trạng thái sinh trưởng của cây con.

- Thí nghiệm 4: Khảo sát ảnh hưởng của chế độ chiếu sáng đến sự phát triển của con *in vitro* trong giai đoạn vườn ươm: Thay đổi các chế độ chiếu sáng khác nhau: ánh sáng khuếch tán trong phòng; ánh sáng khuếch tán trong bóng râm (lưới 60% nắng); ánh sáng tự nhiên. Thí nghiệm tiến hành với cây trồng trên giá thể xơ dừa, với mật độ 1 cây/khóm, cây con được tưới bằng nước máy 2 ngày/lần. Theo dõi kết quả trong 60 ngày với các chỉ tiêu bao gồm tỉ lệ sống và trạng thái sinh trưởng của cây con.

Xử lý số liệu: Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên được lặp lại tùy từng thí nghiệm. Số liệu thu thập được xử lý bằng Microsoft excel dưới dạng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả khử trùng tạo mẫu sạch bệnh và tái sinh protocorm

Quả lan sau khi thu được giữ tươi và tiến hành khử trùng theo các bước trình bày ở mục 2.2.1. Theo dõi hạt trên môi trường thí nghiệm sau khi gieo nhận thấy, tỉ lệ mẫu nhiễm ít (có thể do $HgCl_2$ có hiệu quả cao trong diệt nấm, khuẩn và phù hợp với mẫu lan nuôi cấy). Quan sát sự nảy mầm của hạt nhận thấy, tỷ lệ hạt nảy mầm trong khoảng thời gian khử trùng 6 phút là 15/19 bình thí nghiệm (chiếm 84,2%), với thời gian khử trùng 10 phút, bình mẫu không nhiễm đạt 10/14 (chiếm 78,57%). Sau khi gieo hạt khoảng 20 đến 30 ngày, hạt chuyển dần sang màu xanh và rất nhanh sau đó toàn bộ khối mẫu trong bình nuôi cấy chuyển sang màu xanh. Tuy nhiên, ở Hoàng thảo trầm, chúng tôi nhận thấy các hạt nảy mầm có xu hướng tạo cây con, các hạt tách rời nhau và tạo lá mầm nhỏ chứ không kết dính thành khối như một số loại lan khác [12], [14]. Kết quả nghiên cứu được thể hiện ở bảng 1, hình 1A1.

Bảng 1. Kết quả hình thành protocorm từ hạt của Lan Hoàng thảo Trầm

Thời gian khử trùng (phút)	Số bình nuôi cấy	Số bình bị nhiễm					Số bình không nhiễm	Số bình có hạt nảy mầm
		Sau 4 ngày	Sau 10 ngày	Sau 14 ngày	Tổng	Tỷ lệ (%)		
6	19	0	4	0	4	15,8	15	15
10	14	0	1	0	1	6,67	13	10

3.2. Kết quả nghiên cứu sự phát sinh protocorm từ mẫu thí nghiệm

3.2.1. Ảnh hưởng của BAP và kinetin đến sự phát sinh chồi từ protocorm

Trong nghiên cứu vi nhân giống các loài thuộc chi *Dendrobium*, việc bổ sung các chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm auxin, cytokinin vào môi trường nuôi cấy thường được tiến hành, phổ biến nhất là BAP, kinetin, NAA... Các hormone sinh trưởng có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp với nhau trong cùng một nhóm hoặc khác nhóm [8]. BAP và kinetin là hormone sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin có vai trò quan trọng trong phân chia tế bào và kích thích sự hình thành chồi. Do đó, BAP và kinetin thường được sử dụng trong giai đoạn phát sinh protocorm và nhân chồi. Trong thí nghiệm này, chúng tôi nghiên cứu tác động riêng rẽ của BAP và kinetin đến sự phát sinh chồi từ protocorm lan Hoàng thảo trầm.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BAP và kinetin đến phát sinh protocorm

Môi trường	Nồng độ BAP (mg/l)	Nồng độ kinetin (mg/l)	Kích thước trung bình khối protocorm (cm)	Đặc điểm hình thái khối protocorm
CT1	0,5		0,45 ± 0,16	Xanh nhạt, mảnh
CT2	1		0,6 ± 0,25	Xanh lục, rời rạc
CT3	1,5	-	0,99 ± 0,12	Xanh lục, rời rạc
CT4	2		0,67 ± 0,14	Xanh lục, rời rạc
CT5		0,5	0,56 ± 0,18	Xanh lục, mảnh
CT6		1	0,8 ± 0,22	Xanh lục, mập
CT7	-	1,5	1,05 ± 0,26	Xanh lục, mập
CT8		2	0,87 ± 0,31	Xanh lục, mập

Để nghiên cứu ảnh hưởng của cytokinin đến khả năng phát sinh protocorm, thí nghiệm đã sử dụng môi trường MS cơ bản có bổ sung đường 20 g/l; agar 8 g/l; than hoạt tính 1 g/l và kích thích sinh trưởng BAP, kinetin ở các nồng độ khác nhau (bảng 2). Theo dõi các chỉ tiêu thí nghiệm trong 30 ngày. Kết quả thu được ở bảng 2 cho thấy, khi bổ sung BAP ở nồng độ thấp 0,5 - 1 mg/l thì kích thước khối protocorm rất nhỏ chỉ đạt 0,45 - 0,6 cm. Kích thước khối protocorm tăng lên khi tăng nồng độ BAP và đạt 0,99 cm ở nồng độ 1,5 mg/l. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ lên 2 mg/l BAP thì kích thước khối protocorm lại giảm (0,67 cm). Điều đó cho thấy khi nồng độ BAP quá cao sẽ gây ức chế sự sinh trưởng của protocorm trong nuôi cấy *in vitro* *Dendrobium parishii*. Ngoài ra, quan sát kết quả thí nghiệm còn nhận thấy, trong môi trường có bổ sung BAP, với nồng độ càng cao thì khả năng kết dính của các protocorm càng thấp và trở nên rời rạc nằm rải rác trên bề mặt thạch.

Trên môi trường bổ sung kinetin, ở nồng độ 0,5 mg/l kích thước khối protocorm chỉ đạt 0,56 cm, khi tiếp tục tăng nồng độ chất kích thích sinh trưởng thì kích thước khối protocorm cũng tăng lên và đạt cao nhất ở 1,5 mg/l với kích thước là 1,05 cm. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nồng độ lên 2 mg/l thì kích thước protocorm lại giảm xuống còn 0,87 cm.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, BAP và kinetin có tác dụng lên quá trình phát sinh protocorm, công thức môi trường CT3 và CT7 cho khả năng phát sinh protocorm cao nhất tương ứng với nồng độ BAP, kinetin là 1,5 mg/l, trong đó môi trường bổ sung kinetin có hình thái khối protocorm có màu xanh đậm, protocorm cũng mập, khỏe hơn (Hình 1A2, A3).

3.2.2. Ảnh hưởng của hàm lượng chất hữu cơ bổ sung đến sự phát sinh protocorm

Bên cạnh việc bổ sung các hormone sinh trưởng vào môi trường nuôi cấy *in vitro*, một số nghiên cứu cũng còn bổ sung thêm dịch nghiền từ một số loại củ quả như cà rốt, khoai tây, chuối xanh để thúc đẩy quá trình sinh trưởng nhanh của mẫu nghiên cứu [12], [13]. Dịch chiết củ quả thường chứa những thành phần có tác dụng kích thích sự sinh trưởng của mô tế bào như các vitamin, hormone tự nhiên... Trong nghiên cứu này, các thí nghiệm được bố trí như trình bày trong mục 2.2.2. Kết quả thu được ở bảng 3 cho thấy, ảnh hưởng rõ rệt của các chất bổ sung lên sự phát sinh và phát triển của protocorm. Khi bổ sung dịch chuối nghiền vào các môi trường với hàm lượng tăng dần từ 20 – 40 g/l thì kích thước khối protocorm tăng lên lần lượt là 0,56 cm, 0,72 cm và đạt cao nhất là 1,36 cm ở môi trường có bổ sung 40 g/l chuối xanh nghiền. Tuy nhiên, khi tăng hàm lượng chuối xanh lên 50 g/l thì kích thước khối protocorm giảm xuống còn 1,19 cm. Như vậy, hàm lượng chuối xanh nghiền thích hợp nhất cho giai đoạn phát sinh protocorm *Dendrobium parishii* là 40 g/l (Hình 1B1).

Đối với môi trường bổ sung khoai tây nghiền lần lượt là 30 g/l, 40 g/l thì kích thước của khối protocorm đạt 0,65 cm và 1,24 cm, khi tăng hàm lượng khoai tây nghiền lên 50 g/l đã gây ức chế khả năng phát sinh protocorm, kích thước khối protocorm giảm còn 1,03 cm (Hình 1B2).

Bảng 3. Ảnh hưởng các chất bổ sung lên sự phát triển protocorm

Chất bổ sung	Hàm lượng (g/l)	Kích thước TB khối protocorm (cm)	Đặc điểm hình thái khối protocorm
Chuối xanh nghiền	20	0,56 ± 0,11	Xanh, mập
	30	0,72 ± 0,15	Xanh, mập
	40	1,36 ± 0,13	Xanh, mập
	50	1,19 ± 0,17	Xanh, mập
Khoai tây nghiền	30	0,65 ± 0,13	Xanh, mập
	40	1,24 ± 0,17	Xanh, mập
	50	1,03 ± 0,14	Xanh, mập
Cà rốt nghiền	30	0,46 ± 0,12	Xanh, mảnh
	40	0,83 ± 0,16	Xanh, mảnh
	50	0,55 ± 0,14	Xanh, mảnh
	60	0,48 ± 0,11	Xanh, mảnh

Môi trường có bổ sung cà rốt nghiền, hàm lượng 30 g/l và 40 g/l cho kích thước khối protocorm lần lượt là 0,46 cm và 0,83 cm. Tuy nhiên, khi tăng hàm lượng lên 50 g/l và 60 g/l thì gây ức chế khả năng phát sinh protocorm, kích thước khối protocorm giảm xuống là 0,55 cm và 0,48 cm, ngoài ra các khối protocorm sinh trưởng trên môi trường bổ sung cà rốt nghiền có hình thái xanh nhưng mảnh (Hình 1B3).

Kết quả thu được cho thấy, đối với môi trường bổ sung dịch nghiền củ/quả, sự hình thành và phát triển protocorm tích cực hơn so với môi trường không bổ sung, điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đây trên đối tượng cây lan. Jaime và cộng sự khi tổng hợp các nghiên cứu vi nhân giống *Dendrobium* cho thấy các chất phụ gia thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy *Dendrobium* là nước dừa, than hoạt tính, chiết suất chuối, peptone và một số những chất khác [8]. Các dịch chiết tự nhiên thường chứa niacin và một số vitamin có tác dụng kích thích sự nảy mầm và sinh trưởng của cây lan [12]-[15]. Trong nghiên cứu này, so sánh sự phát sinh protocorm ở các môi trường chứa chất bổ sung gồm chuối xanh, khoai tây và cà rốt nghiền nhận thấy, môi trường bổ sung chuối nghiền với hàm lượng 40 g/l là tốt nhất cho sự phát sinh protocorm ở lan *D. parishii*, các cụm protocorm có kích thước lớn nhất với hình thái xanh đậm, to mập. Điều này khác biệt với nghiên cứu của Nguyễn Thị Hải Yến và cộng sự (2021) trên cây *Dendrobium nobile* Lind, nhóm tác giả kết luận rằng bổ sung khoai tây nghiền với hàm lượng 50 g/l vào môi trường nuôi cấy cho tỉ lệ phát sinh chồi cây *Dendrobium nobile* Lind tốt nhất [14]. Điều đó cho thấy chất bổ sung thực sự có tác dụng tốt trong nghiên cứu nhân giống các loài lan chi *Dendrobium* và mỗi loài khác nhau thích hợp với loại củ quả nghiền khác nhau.

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện chăm sóc đến sinh trưởng và phát triển của lan *P. parishii* in vitro trong vườn ươm

Do điều kiện thời gian, thí nghiệm không khảo sát ảnh hưởng của nồng độ các chất kích thích sinh trưởng lên sự hình thành rễ *D. parishii* in vitro. Qua tham khảo các tài liệu nghiên cứu về nhân giống, chúng tôi lựa chọn NAA với nồng độ 0,5 mg/l để tiến hành ra rễ cho các chồi lan *D. parishii* in vitro, đây cũng là nồng độ thích hợp nhất khi khảo sát ảnh hưởng của IAA, IBA và NAA (nồng độ từ 0 – 1,5 mg/l) đến quá trình nuôi cấy in vitro cây *D. heperocapum*. Lind [12]. Các chồi phát sinh từ protocorm được tách riêng lẻ và cấy lên môi trường MS bổ sung NAA với nồng độ 0,5 mg/l để kích thích tạo rễ. Khi cây con in vitro đã đạt đủ tiêu chuẩn (cao từ 2 – 4 cm, mang 3 - 4 lá, rễ từ 2 cái trở lên, cây cứng cáp), tiến hành đưa cây ra vườn ươm. Các thí nghiệm được tiến hành như trình bày trong mục 2.2.3 nhằm khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện chăm sóc như giá thể, phân bón, ánh sáng... đến quá trình sinh trưởng cây con in vitro.

Với thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của giá thể ra cây đối với *D. parishii* in vitro nhận thấy, các giá thể khác nhau ảnh hưởng rất lớn tới tỉ lệ sống/chết của cây con. Tỷ lệ chết cao nhất là giá thể than củi, 75% cây con bị chết sau 15 ngày ra cây (Hình 1C1), tiếp đến là giá thể vỏ thông với tỉ lệ sống sót của cây con chỉ đạt 35% (Hình 1C2). Các cây con sống sót trên 2 loại giá thể này có màu xanh nhạt, phát triển kém. Như vậy, than củi và vỏ thông không phù hợp làm giá thể ra cây *D. parishii* in vitro mặc dù than củi được sử dụng phổ biến để trồng loài lan này khi thu hái từ rừng về. Khi sử dụng giá thể dớn, tỷ lệ sống sót thu được là 50%, tuy nhiên cây phát triển kém, lá cây có màu xanh nhạt (Hình 1C3). Trên giá thể rêu, tỷ lệ cây sống sót tăng lên đáng kể đạt 62,5%, các cây con có màu xanh, phát triển tốt. Tuy nhiên, sau 20 ngày ra cây thì các cây con có biểu hiện chậm phát triển, lá xanh nhạt dần (Hình 1C4). Nguyên nhân có thể do độ thoáng của rêu chưa đảm bảo, rễ cây tích nước nên có hiện tượng bị úng. Tỷ lệ sống sót cao nhất khi sử dụng giá thể xơ dừa, đạt 87,5%, cây con sinh trưởng và phát triển tốt, cây mập màu xanh đậm (Hình 1C5).

Với thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của mật độ trồng cây *D. parishii* in vitro nhận thấy, khi trồng cây với số lượng 1 cây/bầu cho tỷ lệ sống cao nhất là 90,11% (bảng 4) tỷ lệ này giảm xuống khi tăng số cây/bầu lên 2 - 4 cây/bầu (Hình 1 D2 - D4), điều này trái ngược với đặc điểm sinh trưởng trong tự nhiên của các loài *Dendrobium* là loại đa thân, thường sống thành cụm. Có

thể giải thích do cây con *in vitro* có sức đề kháng kém, khi trồng ở mật độ cao dễ nhiễm bệnh nấm, khuẩn dẫn đến giảm tỉ lệ sống sót.

Bảng 4. Ảnh hưởng của giá thể, mật độ cây và dung dịch tưới đến sự phát triển lan *D. parishii in vitro* giai đoạn vườn ươm

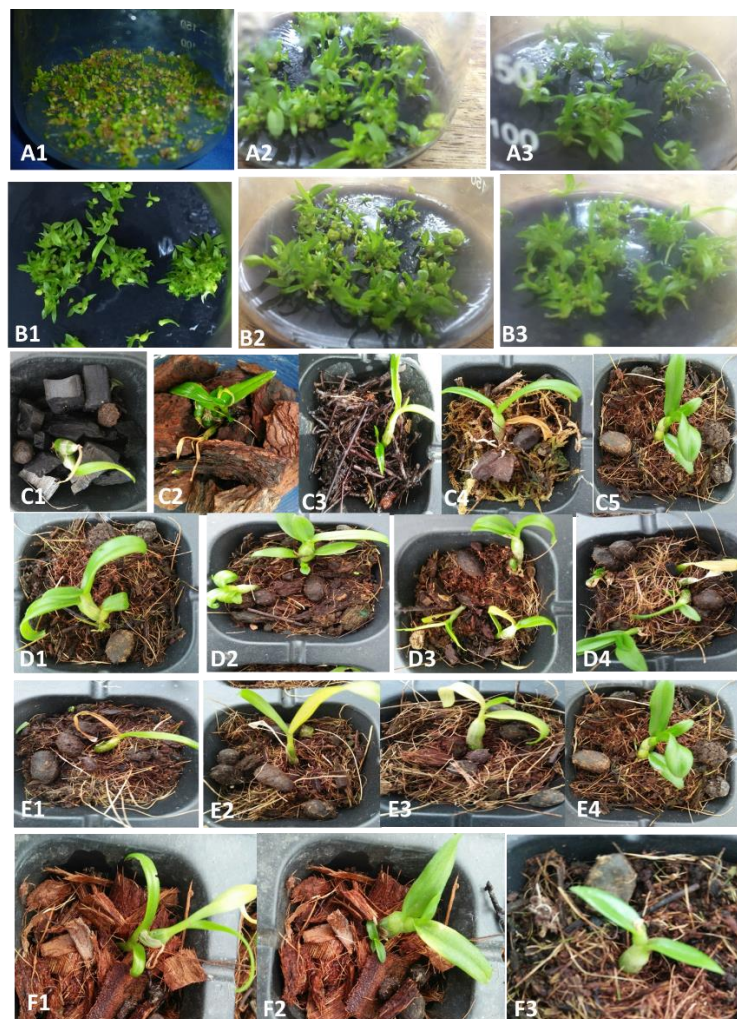
Thí nghiệm	Công thức	Tỷ lệ sống (%)	Trạng thái sinh trưởng của cây con
Giá thể	Dón	50 ± 1,48	Cây sống phát triển rất kém
	Than củi	25 ± 1,49	Sức sống của cây kém
	Rêu	62,5 ± 3,15	Cây con sinh trưởng và phát triển khá tốt
	Xơ dừa	87,5 ± 2,33	Cây con sinh trưởng và phát triển tốt, cây xanh
	Vỏ thông	35 ± 2,32	Cây con sinh trưởng chậm
Mật độ cây	1 cây/bầu	90,11 ± 0,92	Cây phát triển tốt lá xanh đậm.
	2 cây/bầu	84,09 ± 1,12	Cây phát triển chậm hơn, lá xanh đậm.
	3 cây/bầu	65,44 ± 2,59	Cây phát triển chậm, lá xanh nhạt.
	4 cây/bầu	51,67 ± 2,18	Cây kém phát triển, lá xanh nhạt.
Dung dịch tưới	Nước máy	87,35 ± 2,78	Cây sinh trưởng tốt
	Nước máy : MS (4:1)	49,15 ± 1,42	Lá có màu xanh nhạt
	Nước máy : MS (3:1)	41,38 ± 3,11	Lá hơi vàng
	Nước máy : MS (2:1)	10,25 ± 1,15	Cây héo úa

Bảng 5. Ảnh hưởng của chế độ chiếu sáng đến sự phát triển lan *P. parishii in vitro* sau khi ra cây

Chế độ ánh sáng	Chiều cao cây (cm)				Trạng thái Sinh trưởng
	Ban đầu	Sau 20 ngày	Sau 40 ngày	Sau 60 ngày	
Trong phòng	5 ± 0,5	6,9 ± 1,8	8,1 ± 2,05	11,5 ± 3,17	Cây vươn cao, lá nhỏ, màu nhạt
Che lưới 60% nắng	5 ± 0,97	6,1 ± 2,10	7,8 ± 1,16	9,3 ± 2,39	Thân cao vừa, lá to, màu xanh đậm
Ánh sáng tự nhiên	5 ± 0,5	5,5 ± 1,97	7 ± 1,34	8,1 ± 3,06	Thân thấp, lá vàng, có vết nhăn và khô, mép lá có xu hướng cuộn vào

Với thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của dung dịch tưới lên *D. parishii in vitro* nhận thấy, dung dịch MS ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của cây lan con *in vitro*. Mức độ ảnh hưởng phụ thuộc tỉ lệ dung dịch MS. Khi sử dụng nước máy tưới cây con sinh trưởng và phát triển bình thường, tỷ lệ sống cao, đạt 87,35% (Hình 1E4). Khi sử dụng dung dịch nước máy pha MS theo tỷ lệ lần lượt là 4:1, 3:1 và 2:1 nhận thấy khả năng sống sót giảm tương ứng với sự tăng lên của tỉ lệ MS, tỷ lệ sống sót lần lượt là: 49,15%; 41,38% và 10,25% (Hình 1 F1 – E3). Như vậy, dung dịch MS làm ức chế sự sinh trưởng của cây con *in vitro*. Hiện tượng này có thể giải thích là do MS khô đi tạo thành muối đọng bám trên giá thể làm giảm khả năng hút nước của cây, gây ảnh hưởng đến sinh trưởng của cây lan con.

Với thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của chế độ chiếu sáng lên *D. parishii in vitro* nhận thấy, chế độ chiếu sáng có ảnh hưởng khá quan trọng đến sự phát triển của cây. Khi để cây trong phòng, mặc dù thân cây vươn cao đạt 6,9 cm sau 20 ngày theo dõi, sau 40 ngày đạt 8,1 cm và 11,5 cm sau 60 ngày, cao vượt trội hơn hẳn các chế độ chiếu sáng khác, tuy nhiên lá lại rất nhỏ và nhạt màu, biểu hiện sức sống yếu (Hình 1 F1). Với những cây sinh trưởng trong điều kiện che lưới 60% nắng thì chiều cao cây đạt 6,1 cm sau 20 ngày theo dõi, sau 40 ngày đạt 7,8 cm và đạt 9,3 cm sau 60 ngày, cây phát triển rất tốt (Hình 1F2). Đối với chế độ chiếu sáng trực tiếp, cây có chiều cao thấp hơn hẳn chỉ đạt 5,5 cm sau 20 ngày, 7 cm sau 40 ngày và 8,1 cm sau 60 ngày, cây đanh, màu xanh nhạt ngả vàng, lá có các vết nhăn, khô và mép lá cuộn vào (Hình 1 F3).



Hình 1. Nhân giống *in vitro* *Dendrobium parishii*. A1. Protocorm được hình thành từ hạt;

A2, A3. protocorm trên môi trường bổ sung BAP 1,5 mg/l (A2) và kinetin 1,5 mg/l (A3);

B1-B3. Protocorm trên môi trường bổ sung chuối 40 g/l (B1), khoai tây 40 g/l (B2) và cà rốt 40 g/l (B3);
C1-C4. Cây sinh trưởng trên các giá thể khác nhau: Than củi (C1); Vỏ thông (C2); Dớn (C3); Rêu (C4) và xơ dừa (C5); D1-D4. Ảnh hưởng mật độ cây/bầu lên sinh trưởng cây con: 1 cây/bầu (D1); 2 cây/bầu (D2); 3 cây/bầu (D3); 4 cây/bầu (D4); E1-E4. Ảnh hưởng chế độ tưới: 1 MS/2 nước máy (E1); 1 MS/3 nước máy (E2); 1 MS/4 nước máy (E3); nước máy (E4); F1-F3. Ảnh hưởng chế độ chiếu sáng đến cây con *in vitro*: Trong phòng (F1); Che lưới 60 % nắng (F2); Nắng trực tiếp (F3)

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã khảo sát một số điều kiện nuôi cấy *in vitro* và chăm sóc cây con giai đoạn vườn ươm thì môi trường phát sinh protocorm từ hạt sạch phù hợp của *D. parishii* là MS bổ sung BAP hoặc kinetin 1,5 mg/l. Bổ sung chuối xanh nghiền với hàm lượng 40 g/l vào môi trường nuôi cấy cho tỉ lệ phát sinh protocorm là tốt nhất. Cây con *in vitro* giai đoạn vườn ươm được chăm sóc phù hợp với các điều kiện bao gồm: giá thể trồng cây con *in vitro* phù hợp là xơ dừa; mật độ trồng là 1 cây/bầu; tưới ban đầu bằng nước máy 2 ngày/lần và sử dụng lưới 60% nắng để che cho cây.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] POWO, "Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew" Retrieved 24 November 2022. [Online]. Available: <http://www.plantsoftheworldonline.org/>. [Accessed March 2022].
- [2] D. H. Duong, *Vietnamese flora*. Science and Technology Publishing House, 2007.
- [3] W. Yue-Hu, "Traditional Uses and Pharmacologically Active Constituents of *Dendrobium* Plants for Dermatological Disorders: A Review," *Natural Products and Bioprospecting*, vol. 11, pp. 465-487, 2021, doi: 10.1007/s13659-021-00305-0
- [4] J. Jakaphun, S. Thanapat, K. Chalermopol, C. Aueporn, and C. Sunee, "Chemical composition of the Essential Oils from Cell Culture of *Dendrobium parishii* Rchb. f.," *CMU. J. Nat. Sci.*, vol. 12, no. 2, 2013, doi: 10.12982/CMUJNS.2013.0008.
- [5] G. Seidenfaden, "Orchid genera in Thailand 12. *Dendrobium* Sw.," *Opera Bot.*, vol. 83, pp. 26-57, 1985.
- [6] Ministry of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, *VietNam red book. Part II. Plant*. Natural Science and Technology Publishing House, 2007.
- [7] H. Tran, *Viet Nam orchid*. Ha Noi Agriculture Publishing House, 1988.
- [8] A. Jaime, S. D. Teixeira, C. C. Jean, J. Dobránszki, and Z. Songjun, "*Dendrobium* micropropagation: a review," *Plant Cell Rep*, vol. 34, pp. 671-704, 2015.
- [9] S. Rao and B. Barman, "*In vitro* micropropagation of *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl. A threatened orchid," *SAJB*, vol. 2, pp. 39-42, 2014.
- [10] T. S. Nguyen, B. T. Tu, T. N. Dang, T. L. A. Nguyen, T. N. Hoang, and Q. T. Nguyen, "*In vitro* propagation of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo," *Journal of Science and Development*, vol. 12, pp. 1274-1282, 2014.
- [11] V. V. Nguyen, "Using *in vitro* culture technique for the propagation of *Dendrobium lituiflorum* Lindley," *Journal of Forestry Science and Technology*, vol. 4, pp. 39-45, 2017.
- [12] T. T. Dang, N. B. H'Yon, T. T. H. Nguyen, V. K. Dinh, V. D. Nong, T. V. Tran, V. H. Quach, and K. C. Vu, "Micropropagation of *Dendrobium heterocarpum* Lindl.," *Journal of Biotechnology*, vol. 16, pp. 127-135, 2018.
- [13] T. Murashige and F. Skoog, "A Revised Medium for Rapid Growth and BioAssays with Tobacco Tissue Cultures," *Physiologia Plantarum*, vol. 15, pp. 473-497, 1962.
- [13] Y. Li, D. H. Zhu, H. T. Pan, and Q. X. Zhang, "*In vitro* propagation of three *Dendrobium* species from stems," *J Northeast Forest Univ*, vol. 41, pp. 77-81, 2013.
- [14] T. H. Y. Nguyen and N. N. Tran, "Study on *in vitro* propagation of *Dendrobium nobile* Lindl.," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 225, no. 11, pp. 68-75, 2020.
- [15] M. O. Islam, S. Matsui, and S. Ichihashi, "Effect of complex organic additives on seed germination and carotenoid content in *Cattleya* seedlings," *Lindleyana*, vol. 15, pp. 81-88, 2000.