

NHÂN GIỐNG *in vitro* LAN THANH ĐẠM TUYẾT NGỌC (*Coelogyne mooreana* SANDER EX ROLFE)

**H'Yon Niê Bing*, Đặng Thị Thắm, Nguyễn Thị Thanh Hằng, Đinh Văn Khiêm,
Nông Văn Duy, Vũ Kim Công, Quách Văn Hợi, Trần Thái Vinh**

Viện Nghiên cứu khoa học Tây Nguyên

*Email**: hyonniebing87@gmail.com

Ngày gửi bài: 17.01.2016

Ngày chấp nhận: 15.07.2016

TÓM TẮT

Lan Thanh đạm Tuyết ngọc (*Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe) là loài lan đặc hữu của Việt Nam. Đây là nguồn gen quý hiếm và độc đáo với hoa to đẹp, màu trắng, tỏa hương thơm, có thể trồng làm cảnh. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu nhân giống *in vitro* với mục đích bảo tồn và phát triển nguồn gen loài lan quý này. Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường nuôi cấy thích hợp cho loài lan này là: MS (Murashige and Skoog, 1962) + 1,0 mg/l BA (6 - benzyl adenine) + 0,5 mg/l NAA (1 - Naphthylacetic acid) và cho số PLB (Protocorm like body)/mẫu cấy cao nhất (6,62) và tỷ lệ mẫu tạo PLB là 86,63%. Các PLB này được sử dụng để tiến hành các thí nghiệm tái sinh chồi *in vitro*, kết quả tái sinh chồi tối ưu ở môi trường nuôi cấy MS + 0,3 mg/l NAA + 2,0 mg/l BA cho trung bình (TB) 14 chồi/cụm, chiều cao TB là 2,72 cm và số lá TB/chồi là 3. Sử dụng các chồi có chiều cao tương đối đồng đều khoảng 3 cm cho các thí nghiệm ra rễ. Tỷ lệ ra rễ đạt 100% ở nghiệm thức với nồng độ NAA 0,5 mg/l, số lượng rễ TB 3,8 rễ/chồi, chiều dài rễ TB 1,66 cm, rễ mập với nhiều rễ phụ.

Từ khóa: Chất điều hòa sinh trưởng, *Coelogyne mooreana*, đỉnh chồi, *in vitro*, PLB.

***in vitro* Propagation of *Coelogyne mooreana* Sander Ex Rolfe**

ABSTRACT

In this study, *in vitro* mass propagation of *Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe, an endemic orchid (of Vietnam) with its beautiful large, white flowers and fragrance having horticultural potential was accomplished through protocorm formation from shoot tips and subsequent plant regeneration. In the first procedure, shoot tips from *in vitro* germinated seedlings were cultured on Murashige and Skoog medium (MS) supplemented with a range of 6 - benzylaminopurine (BA) in combination with naphthalene acetic acid (NAA) to determine the best medium for the protocorm formation. The results showed that MS medium supplemented with 1.0 mg/l BA and 0.5 mg/l NAA was the most suitable for protocorm formation (6.62 protocorms và formation rate of 86.63%). For subculture, maximum growth of shoots (14 shoots, 2.72 cm height and 3 leaves/shoot) was obtained on MS medium supplemented with 0.3 mg/l NAA and 2.0 mg/l BA. The highest frequency of rooting (100%) was observed on ½MS medium supplemented with 20 g/l sucrose, 8 g/l agar, 1 g/l activated charcoal (AC), 10% coconut water (CW) and 0.5 mg/l NAA. On this medium, the seedlings reached an average length of 1.66 cm with 3.8 roots per seedling. A successful protocol for micropropagation by shoot tips will contribute to the development of a suitable management program of *C. mooreana* Sander ex Rolfe.

Keywords: *Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe, *in vitro* micropropagation, shoot tips, protocorm.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan là một trong những nhóm thực vật nổi tiếng với các loài hoa đa dạng và độc đáo

(Basker and Bai, 2006). Tuy nhiên số lượng loài lan trong tự nhiên hiện nay đang có xu hướng giảm đi do những ảnh hưởng bất lợi của điều kiện môi trường sống và sự khai thác quá mức

của con người. Trong tự nhiên, cây lan nhân giống chủ yếu bằng hình thức sinh sản vô tính là nhân chồi nhưng hệ số nhân giống thấp. Bên cạnh đó, hạt lan trong tự nhiên rất khó nảy mầm vì không có nội nhũ (Trần Hợp, 1998). Hiện nay cùng với sự phát triển trong công nghệ sinh học thì việc nhân giống *in vitro* được xem là phương pháp hữu hiệu nhất để nhân nhanh và bảo tồn nhiều loài lan quý hiếm (Mitra, 1986).

Lan Thanh đậm Tuyết ngọc - *Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe là loài quý, hiếm và đặc hữu của Việt Nam, phân bố chủ yếu ở miền Trung và các tỉnh Quảng Trị, Nha Trang, Lâm Đồng (Nông Văn Duy và cs., 2008). Đây là một trong những loài lan đẹp nhất trên thế giới, được xem là "Hoàng hậu" của chi *Coelogyne* với hoa lớn, dài 2 - 4 cm, màu trắng, có hương thơm, cánh môi chia 3 thùy có nhiều điểm đen và vệt vàng ở giữa (Trần Hợp, 1998).

Trên thế giới đã có các công trình nghiên cứu nhân giống *in vitro* các loài thuộc chi *Coelogyne* như *C. fuscescens* Lindl. (Dharma *et al.*, 2013), *C. ovalis* Lindl., *C. nitida* (Wall. ex Don) Lindl. (Iaibadaiahun Nongrum *et al.*, 2007), *C. mossiae* Rolfe (Joseph *et al.*, 2006), *C. breviscapa* Lindl. (Mohanraj *et al.*, 2009), *C. stricta* (D. Don) Schltr. (Basker. *et al.*, 2006), *C. suaveolens* (Lind.) Hook (Sungkumlong *et al.*, 2008), *C. punctulata* Lindl. (Sharma *et al.*, 1990). Việc nhân giống cây lan Thanh đậm Tuyết Ngọc vẫn chưa được đề cập tới. Để góp phần bảo tồn và phát triển nguồn gen các loài lan quý hiếm thì việc nhân giống *in vitro* loài này là việc làm cấp thiết và có ý nghĩa to lớn.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Đỉnh sinh trưởng có chiều dài từ 2 - 5 cm (Hình b) được tách từ các chậu lan Thanh đậm Tuyết ngọc (*Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe). Nguồn giống lấy từ vườn bảo tồn lan tại Viện Nghiên cứu khoa học Tây Nguyên.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- *Môi trường nuôi cấy:*

Môi trường nền sử dụng trong các thí nghiệm là môi trường khoáng MS hoặc 1/2 MS

có bổ sung thêm 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 1g/l than hoạt tính (THT), 10% nước dừa (CW). Ngoài ra, tùy theo mục đích thí nghiệm mà môi trường nuôi cấy sẽ bổ sung thêm các chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Tất cả các môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH = 5,8 và được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1atm, trong 25 phút. Mẫu sau khi cấy được nuôi trong điều kiện nhiệt độ 25 ± 2°C, cường độ chiếu sáng 35 μm²/s, thời gian chiếu sáng 8 giờ.

- *Phương pháp khử trùng:*

Các chồi non được rửa sạch dưới vòi nước, ngâm trong xà phòng loãng 15 phút rồi rửa sạch xà phòng dưới vòi nước chảy, sau đó khử trùng qua cồn 70° trong 1 phút, tiếp theo khử trùng qua dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 10 phút và cuối cùng được rửa bằng nước cất vô trùng 5 lần. Mẫu sau khi khử trùng tiến hành tách đỉnh sinh trưởng và cấy trên môi trường 1/2 MS có bổ sung 1 mg/l BA, 30 g/l sucrose, 8 g/l agar (Hình c).

- *Khả năng tạo PLB:*

Mẫu được cấy vào môi trường nuôi cấy MS có bổ sung BA (1,0 mg/l; 1,5 mg/l; 2,0 mg/l; 2,5 mg/l) kết hợp NAA (0,2 mg/l; 0,5 mg/l) và BA (1,0 mg/l; 1,5 mg/l; 2,0 mg/l) kết hợp 1 mg/l NAA. Tiếp tục thí nghiệm với môi trường nuôi cấy MS có bổ sung TDZ (0,05 mg/l; 0,1 mg/l; 0,5 mg/l; 1,0 mg/l; 1,5 mg/l) kết hợp NAA (0,5 mg/l).

- *Tái sinh chồi in vitro:*

Cụm protocorm hình thành từ thí nghiệm thí nghiệm tạo PLB được cấy lên môi trường nuôi cấy MS có bổ sung Kinetin (KIN) (0,5 mg/l; 1,0 mg/l; 1,5 mg/l; 2,0 mg/l) riêng rẽ hoặc kết hợp với NAA (0,5 mg/l); BA (2,0 mg/l) kết hợp với NAA (0,1 mg/l; 0,3 mg/l; 0,5 mg/l; 0,7 mg/l; 1,0 mg/l).

- *Tạo rễ, hình thành cây in vitro hoàn chỉnh:*

Chọn những chồi có chiều cao khoảng 3 cm, tương đối đồng đều nhau được cấy trên môi trường nuôi cấy MS có bổ sung riêng rẽ IAA, IBA, NAA ở các nồng độ 0,3 mg/l; 0,5 mg/l; 1,0 mg/l.

Các thí nghiệm bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại. Mỗi nghiệm thức cấy 5

bình, mỗi bình cấy 3 mẫu cấy. Số liệu thu thập xử lý bằng phần mềm Microsorf Excel 2010 và phân tích thống kê SPSS 16.0 theo phương pháp Duncan.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng hình thành PLB của loài *Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe

3.1.1. Ảnh hưởng của BA và NAA đến quá trình hình thành PLB

Sau 30 ngày vào mẫu, chọn những mẫu sạch nấm bệnh được chuyển vào môi trường nuôi cấy có bổ sung BA và NAA với các nồng độ khác nhau để tiến hành thí nghiệm. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Trong thí nghiệm này, các mẫu mô chứa đỉnh sinh trưởng được tách ra có kích thước khoảng 0,8 mm, mang một phát thể lá. Kỹ thuật này cho phép nhân giống với một tỷ lệ nhân giống cao vì bộ phận đỉnh sinh trưởng còn ở giai đoạn non, chứa các tế bào gốc nên quá trình phân chia và phân hóa diễn ra mạnh đồng thời cách này được xem là ổn định về nguồn gen và sạch bệnh.

Dựa vào bảng 1 cho thấy có sự ảnh hưởng khác biệt khi bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng tạo PLB sau 45 ngày nuôi cấy. Khi sử dụng môi trường nuôi cấy MS bổ sung đồng thời BA và NAA ở các nồng độ khác nhau kết quả thu được thể hiện trong bảng 1. Số PLB/mẫu cấy dao động trong khoảng từ 2,49 PLB/mẫu đến 6,62 PLB/mẫu và phần trăm mẫu tạo PLB đạt trong khoảng từ 48,90 - 86,63%. Như vậy, trên môi trường nuôi cấy loài *Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe bổ sung 1 mg/l BA và 0,5 mg/l NAA là môi trường thích hợp tạo PLB, cho số PLB/mẫu cấy cao nhất (6,62) và tỷ lệ mẫu tạo PLB cũng cao nhất (86,63%) (Hình d6). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả của Dharma *et al.* (2013).

Tuy nhiên, nếu tăng nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng BA và NAA lên thì số PLB trên mẫu và tỉ lệ mẫu tạo PLB lại giảm đi (Hình d). Chất điều hòa sinh trưởng có thể kích thích nhưng cũng có thể ức chế sự sinh trưởng của thực vật nuôi cấy *in vitro*, điều này phụ thuộc vào từng loài cũng như từng loại mô được sử dụng khi nuôi cấy.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA và NAA đến quá trình hình thành PLB của chồi đỉnh *Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe

BA (mg/l)	NAA (mg/l)	Số PLB/ mẫu cấy	% mẫu tạo PLB
0	0	1,60 ^g	20,00 ^a
1	0,2	3,47 ^d	57,77 ^{cde}
1,5	0,2	4,6 ^{bc}	60,00 ^{cd}
2	0,2	4,62 ^{bc}	55,53 ^{def}
2,5	0,2	4,75 ^{bc}	62,23 ^c
1	0,5	6,62 ^a	86,63 ^a
1,5	0,5	4,97 ^b	71,11 ^b
2	0,5	4,40 ^c	60,00 ^{cd}
2,5	0,5	4,57 ^{bc}	68,90 ^b
1	1	3,22 ^d	51,10 ^{gh}
1,5	1	3,09 ^{ed}	48,90 ^{gh}
2	1	2,49 ^f	53,30 ^{cde}

Chú thích: Những chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

3.1.2. Ảnh hưởng của TDZ và NAA đến quá trình hình thành PLB

Từ thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của BA và NAA đến quá trình hình thành PLB cho thấy ở nồng độ NAA (0,5 mg/l) kết hợp với BA mẫu cảm ứng tạo PLB tối ưu, vì vậy tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của NAA (0,5 mg/l) kết hợp với TDZ (0,05; 0,1; 0,5; 1; 2 mg/l) lên sự hình thành PLB ở *Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe.

Trên môi trường nuôi cấy bổ sung NAA (0,5 mg/l) và TDZ ở các nồng độ khác nhau, tất cả các nghiệm thức chỉ thu được chồi trực tiếp. Sau 45 ngày chồi phình to, mọng nước, không hình thành PLB đặc biệt ở những nghiệm thức bổ sung TDZ ở nồng độ cao (2 mg/l; 3 mg/l) thì mẫu bị biến dạng và chết. Như vậy, đối với loài *Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe ở thí nghiệm này khi sử dụng TDZ để tạo PLB là không thích hợp.

Môi trường MS + 1 mg/l BA + 0,5 mg/l NAA + 10% CW là tối ưu ở giai đoạn tạo PLB giống lan *Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe.

3.2. Tái sinh chồi *in vitro*

Việc tái sinh chồi từ PLB rất quan trọng trong việc nhân giống *in vitro*, để từ đó phát triển thành cây hoàn chỉnh.

Kết quả phát sinh chồi từ protocorm sau 60 ngày nuôi cấy được trình bày tại bảng 2 cho thấy ở các nghiệm thức đều có sự tạo chồi *in vitro*.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, trong các nghiệm thức thì sự kết hợp giữa NAA và BA đem lại kết quả tốt nhất cho sự tái sinh chồi. Môi trường bổ sung 0,3 mg/l NAA và 2,0 mg/l BA cho kết quả tối ưu nhất với số chồi TB/cụm là 14 với chiều cao TB là 2,72 cm và số lá TB/chồi là 3,00. Như vậy cytokinin có hiệu quả cao trong sự phân chia tế bào, nhưng quá trình này sẽ không có kết quả cao nếu vắng mặt auxin. Trong nghiên cứu này, sự kết hợp của NAA và BA thích hợp cho quá trình tạo chồi từ protocorm và gia tăng đáng kể sự phát triển số lượng chồi của loài *Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe. Trong khi đó các môi trường bổ sung KIN độc lập (1,0 mg/l KIN) có số chồi TB là 7,29; chiều cao chồi TB là 1,63 cm. Còn trong môi

Bảng 2. Ảnh hưởng của NAA, BA và KIN đến khả năng tái sinh chồi *in vitro* của *Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe

NAA (mg/l)	BA (mg/l)	KIN (mg/l)	Số chồi TB/ protocorm	Chiều cao chồi TB (cm)	Số lá TB/chồi
0	0	0	3,35 ^g	1,35 ^f	1,82 ^{cde}
0	0	0,5	5,02 ^f	1,76 ^{cdef}	2,24 ^{bcd}
0	0	1,0	7,29 ^e	1,63 ^{ef}	2,63 ^{ab}
0	0	1,5	4,22 ^{fg}	1,30 ^f	1,62 ^e
0	0	2,0	3,66 ^g	0,83 ^g	1,82 ^{cde}
0,5	0	0,5	5,15 ^f	1,40 ^{ef}	2,42 ^{ab}
0,5	0	1,0	6,49 ^e	1,70 ^{def}	2,33 ^{bc}
0,5	0	1,5	5,13 ^f	1,80 ^{cdef}	2,82 ^{ab}
0,5	0	2,0	6,69 ^e	1,67 ^{ef}	2,35 ^{bc}
0,1	2,0	0	11,49 ^{cd}	1,90 ^{bcd}	2,73 ^{ab}
0,3	2,0	0	14,00 ^a	2,72 ^a	3,00 ^a
0,5	2,0	0	12,73 ^b	2,3 ^{ab}	2,33 ^{bc}
0,7	2,0	0	11,95 ^{bc}	2,23 ^{bc}	2,46 ^{ab}
1,0	2,0	0	10,40 ^d	2,16 ^{bcd}	1,73 ^{de}

Chú thích: Những chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

trường bổ sung 0,5 mg/l NAA + 1,0 mg/l KIN có số chồi TB là 6,49 và chiều cao chồi TB là 1,70 cm. Kinetin cũng có tác dụng đến sự phát triển của chồi từ mẫu cấy tuy nhiên số chồi hình thành thấp hơn so với môi trường bổ sung BA. Nghiên cứu của Basker *et al.* (2006) cho thấy khi nhân chồi loài *Coelogyne Stricta* (D.Don) Schltr cho kết quả tốt nhất ở nồng độ NAA thấp và BA cao. Kết quả này của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Sungkumlong *et al.* (2008) đối với loài *Coelogyne suaveolens* (Lindl.) Hook.

3.3. Tạo rễ, hình thành cây *in vitro*

Đây là giai đoạn cuối của quá trình nhân giống *in vitro* nhằm tạo ra cây con có sức sống cao thích hợp ra vườn ươm. Chọn các chồi có chiều cao khoảng 3cm để tiến hành thí nghiệm tạo rễ. Chồi của *Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe được cấy vào môi trường nuôi cấy 1/2 MS + 20 g/l đường sucrose + 8 g/l agar + 1 g/l THT + 10% CW và có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng IAA, IBA, NAA ở các nồng độ 0,3 mg/l; 0,5 mg/l; 1,0 mg/l. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở bảng 3.

Kết quả bảng 3 cho thấy, trong môi trường không bổ sung chất kích thích sinh trưởng cũng có sự xuất hiện rễ. Tuy nhiên, khi bổ sung chất kích thích sinh trưởng vào môi trường nuôi cấy

sẽ rút ngắn được thời gian tạo rễ, rễ phát triển đồng đều hơn và ảnh hưởng rõ rệt nhất khi bổ sung NAA. Ở các nghiệm thức bổ sung IAA (0,3; 0,5; 1,0 mg/l) cho tỷ lệ ra rễ từ 77,78 - 84,44%; trong đó khi bổ sung 0,5 mg/l IAA cho số rễ cao nhất đạt 2,67 rễ/chồi với chiều dài rễ là 1,12 cm tuy nhiên rễ mảnh và không có rễ phụ (Hình f3). Các nghiệm thức bổ sung IBA cho tỷ lệ ra rễ thấp hơn so với 2 chất kích thích IAA và NAA khi cùng nồng độ, hơn nữa ở các nghiệm thức bổ sung IBA cho rễ ngắn, giòn và dễ gãy (Hình f7). NAA là chất kích thích sinh trưởng phù hợp cho sự ra rễ, đặc biệt nghiệm thức bổ sung 0,5 mg/l NAA là tối ưu với tỷ lệ ra rễ là 100%, số lượng rễ đạt 3,80 rễ/chồi, chiều dài rễ là 1,66 cm, rễ mập với nhiều rễ phụ (Hình f9). Tuy nhiên, khi tăng nồng độ lên 1,0 mg/l thì các phân chóp rễ có sự sinh trưởng giảm xuống. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Dharma *et al.* (2013) đối với loài *Coelogyne fuscescens* Lindl. khi sử dụng NAA (0,5mg/l) để kích thích tạo rễ. Basker and Bai (2006) khi nghiên cứu về *Coelogyne Stricta* (D.Don) Schltr. cũng cho thấy NAA là chất kích thích sinh trưởng phù hợp cho sự ra rễ của cây.

Sau khi chuyển cây từ chai mô ra vườn thì thấy cây mau chóng ổn định và thích nghi. Giá thể dón cho tỷ lệ sống cao và chất lượng cây con tốt: lá xanh đậm, có rễ mới, một số cây bắt đầu hình thành chồi sau 60 ngày.

Bảng 3. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng (IAA, IBA, NAA) lên sự ra rễ của loài *Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe sau 60 ngày nuôi cấy

DHST (mg/l)			Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ TB/ chồi	Chiều dài rễ TB (cm)	Ghi chú
IAA	IBA	NAA				
0	0	0	55,56	1,00 ^g	0,66 ^d	
0,3	0	0	77,78	2,60 ^{abc}	1,06 ^{cd}	
0,5	0	0	84,44	2,67 ^{bc}	1,12 ^{bcd}	Rễ mảnh, không có rễ phụ
1,0	0	0	80,00	2,20 ^{cde}	1,02 ^{cd}	
0	0,3	0	73,33	1,94 ^{def}	0,82 ^{cd}	
0	0,5	0	75,56	1,80 ^{ef}	0,94 ^{cd}	
0	1,0	0	68,89	1,47 ^{fg}	0,78 ^d	Rễ giòn, dễ gãy
0	0	0,3	91,11	3,20 ^{ab}	1,53 ^{ab}	
0	0	0,5	100,00	3,80 ^a	1,66 ^a	Rễ mập, nhiều rễ phụ
0	0	1,0	93,33	2,80 ^{bc}	1,28 ^{abc}	

Chú thích: Những chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test



Hình 1. Quá trình nhân giống *in vitro* *Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe Lan Thanh đậm Tuyết ngọc

Ghi chú: a. Cây Thanh đậm Tuyết ngọc - *Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe ; b. Chồi non của *Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe; c. Vào mẫu chồi non của *Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe; d. Ảnh hưởng của BA và NAA đến quá trình hình thành PLB ở *Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe; e. Ảnh hưởng của BA, KIN và NAA đến khả năng tái sinh chồi *in vitro* của *Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe e1. Nghiệm thức đối chứng; e2. Nghiệm thức 1,0 mg/l KIN; e3. Nghiệm thức 0,5 mg/l NAA+ 1,0 mg/l KIN; e4. Nghiệm thức 0,3 mg/l NAA + 2,0 mg/l BA ; f. Sự hình thành rễ của chồi *Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe với IAA, IBA, NAA lần lượt ở các nồng độ 0,3; 0,5 và 1,0 mg/l.

4. KẾT LUẬN

Môi trường nuôi cấy MS bổ sung 1 mg/l BA và 0,5 mg/l NAA được sử dụng tạo PLB của loài *Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe; Môi trường tái sinh chồi tối ưu nhất là môi trường

MS bổ sung 0,3 mg/l NAA và 2,0 mg/l BA. Môi trường nuôi cấy 1/2 MS bổ sung 0,5 mg/l NAA và 1 g/l than hoạt tính là môi trường ra rễ tối ưu của loài *Coelogyne mooreana* Sander ex Rolfe. Kết quả nghiên cứu này có thể tạo tiền đề cho việc nhân giống quy mô lớn phục vụ cho công tác bảo tồn loài Lan đặc hữu quý hiếm này.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Chương trình Tây Nguyên 3 đã tài trợ cho nghiên cứu này. Đề tài được thực hiện tại Phòng Tài nguyên thực vật, Viện Nghiên cứu khoa học Tây Nguyên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Basker. S and V.Narmatha Bai (2006). Micropropagation of *Coelogyne stricta* Schltr. via pseudobulb segment cultures, Tropical and Subtropical Agroecosystems, 6: 31 - 35.
- Dharma K., Shreeti P. and Bijaya P. (2013). Asymbiotic seed germination and plantlet developmene of *Coelogyne fuscescens* Lindl., a medicinal orchid of Nepal., Scientific World, 11: 11.
- Nông Văn Duy và Nguyễn Thị Lang (2008). Điều tra thu thập, bảo tồn nguồn gen chi Thanh đạm (*Coelogyne* Lindl.) thuộc họ Lan (Orchidaceae Juss.) ở vùng Nam Tây Nguyên. Tuyển tập công trình nghiên cứu Khoa học Công nghệ. Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, 913.
- Trần Hợp (1998). Phong lan Việt Nam. Nhà xuất bản Nông nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh.
- Iaibadaiahun Nongrum, Suman Kumaria and Pramod Tandon (2007). Influence of *in vitro* Media on Asymbiotic Germination, Plantlet Development and *Ex Vitro* Establishment of *Coelogyne ovalis* Lindl. and *Coelogyne nitida* (Wall. ex Don) Lindl., Proc Indian Natn Sci Acad., 73(4): 205 - 207.
- Joseph S., John S.B., Philip J.R., Vinoth D.K. and Senthil S.K. (2006). *in vitro* seed germination and plantlet regeneration of *Coelogyne mossiae* Rolfe, Journal of Biological Research, 5: 79 - 84.
- Mitra G. C. (1986). *in vitro* culture of orchid seeds for obtaining seedlings. In: Vij SP (Ed.). Biology, conservation and culture of orchids, Affiliated East - West Press Private Ltd., New Delhi, 401.
- Mohanraj. R, Ananthan. R, Bai. V. N. (2009). Production and Storage of Synthetic seeds in *Coelogyne breviscapa* Lindl., Asian Journal of Biotechnology, 1: 124 - 128.
- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia plantarum*, 15: 473 - 497.
- Sharma SK and Tandon P. (1990). Asymbiotic germination and seedling growth of *Cymbidium elegans* Lindl. and *Coelogyne punctulata* Lindl. as influenced by different carbon sources. Journal of the Orchid Society of India, 4(1 - 2): 149 - 159.
- Sungkumlong; Deb, C.R. (2008). Effects of different factors on immature embryo culture, PLBs differentiation and rapid mass multiplication of *Coelogyne suaveolens* (Lindl.) Hook.. Indian Journal of experimental biology, 46(4): 243 - 248.