VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
CHƯƠNG TRÌNH KH&CN CẤP QUỐC GIA GIAI ĐOẠN 2016 - 2020
KHCN-TN/16-20
"Khoa học và công nghệ phục vụ phát triển kinh tế - xã hội Tây Nguyên trong liên kết vùng và hội nhập quốc tế"
(Chương trình Tây Nguyên 2016 – 2020)

BÁO CÁO TỔNG HỢP

KẾT QUẢ ĐỀ TÀI KHOA HỌC CÔNG NGHỆ CẤP QUỐC GIA

NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN, SỬ DỤNG VÀ BẢO TỒN BỀN VỮNG 05 LOÀI LAN (*DENDROBIUM NOBILE, DENDROBIUM TRANKIMIANUM, PAPHIOPEDILUM VILLOSUM, PHAIUS BAOLOCENSIS VÀ PHAIUS TANKERVILLEAE*) ĐẶC HỮU, QUÝ HIẾM VÀ CÓ GIÁ TRỊ KINH TẾ CAO, PHỤC VỤ PHÁT TRIỂN KINH TẾ - XÃ HỘI TẠI LÂM ĐỒNG - TÂY NGUYÊN

MÃ SỐ: TN18/T08 (2018 - 2021)

Chủ nhiệm đề tài: TS. Nông Văn Duy
Cơ quan chủ trì: Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

LÂM ĐỒNG - 2021

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
CHƯƠNG TRÌNH KH&CN CẤP QUỐC GIA GIAI ĐOẠN 2016 - 2020
KHCN-TN/16-20
"Khoa học và công nghệ phục vụ phát triển kinh tế - xã hội Tây Nguyên trong liên kết vùng và hội nhập quốc tế"
(Chương trình Tây Nguyên 2016 – 2020)

BÁO CÁO TỔNG HỢP
KẾT QUẢ ĐỀ TÀI KHOA HỌC CÔNG NGHỆ CẤP QUỐC GIA

NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN, SỬ DỤNG VÀ BẢO TỒN BỀN VỮNG 05 LOÀI LAN (*DENDROBIUM NOBILE, DENDROBIUM TRANKIMIANUM, PAPHIOPEDILUM VILLOSUM, PHAIUS BAOLOCENSIS VÀ PHAIUS TANKERVILLEAE*) ĐẶC HỮU, QUÝ HIẾM VÀ CÓ GIÁ TRỊ KINH TẾ CAO, PHỤC VỤ PHÁT TRIỂN KINH TẾ - XÃ HỘI TẠI LÂM ĐỒNG - TÂY NGUYÊN

MÃ SỐ: TN18/T08 (2018 - 2021)

CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI

TS. Nông Văn Duy

CHƯƠNG TRÌNH TÂY NGUYÊN
2016 - 2020

VIỆN NGHIÊN CỨU
KHOA HỌC TÂY NGUYÊN

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN NGHIÊN CỨU KHOA HỌC TÂY NGUYÊN

Viện trưởng: Nguyễn Hữu Toàn Phan

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

LÂM ĐỒNG - 2021

VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔN NGHỆ VN
VIỆN NGHIÊN CỨU
KHOA HỌC TÂY NGUYÊN

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Lâm Đồng, ngày 29 tháng 6 năm 2021

BÁO CÁO THỐNG KÊ
KẾT QUẢ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI

I. THÔNG TIN CHUNG

1. Tên đề tài: Nghiên cứu phát triển, sử dụng và bảo tồn bền vững 05 loài Lan *(Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis và Phaius tankervilleae)* đặc hữu, quý hiếm và có giá trị kinh tế cao, phục vụ phát triển kinh tế - xã hội tại Lâm Đồng - Tây Nguyên.

Mã số đề tài: TN18/T08

Thuộc chương trình: Khoa học và Công nghệ phục vụ phát triển kinh tế - xã hội vùng Tây Nguyên trong liên kết vùng và hội nhập quốc tế. Mã số: KHCN-TN/16-20.

2. Chủ nhiệm đề tài:

Họ và tên: Nông Văn Duy

Ngày, tháng, năm sinh: 31/7/1970 Nam/Nữ: Nam

Học hàm, học vị: Tiến sĩ

Chức danh khoa học: Tiến sĩ, Nghiên cứu viên chính.

Chức vụ: Phó Viện trưởng

Điện thoại: Tổ chức: 02633 822078 Mobile: 0982311769

Fax: 02633 831028 E-mail: duynongvan@yahoo.com

Tên tổ chức đang công tác: Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên

Địa chỉ tổ chức: 116 Xô Viết Nghệ Tĩnh, Phường 7, Đà Lạt, Lâm Đồng

Địa chỉ nhà riêng: 28 Võ Trường Toản, Phường 8, Đà Lạt, Lâm Đồng

3. Tổ chức chủ trì đề tài:

Tên tổ chức chủ trì đề tài: Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên

Điện thoại: 02633 822078 Fax: 02633 031028

E-mail: vanthu@tni.vast.vn

Website: www.tni.ac.vn

Địa chỉ: 116 Xô Viết Nghệ Tĩnh, Phường 7, Đà Lạt, Lâm Đồng

Họ và tên thủ trưởng tổ chức: Nguyễn Hữu Toàn Phan

Số tài khoản: 3713.0.9077611.00000

Ngân hàng: Kho bạc Nhà nước tỉnh Lâm Đồng

Tên cơ quan chủ quản đề tài: Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên

II. TÌNH HÌNH THỰC HIỆN

1. Thời gian thực hiện đề tài:

- Theo Hợp đồng đã ký kết: từ tháng 07 năm 2018 đến tháng 12 năm 2020
- Thực tế thực hiện: từ tháng 07 năm 2020 đến tháng 03 năm 2021
- Được gia hạn: đến hết tháng 3/2021

2. Kinh phí và sử dụng kinh phí:

a) Tổng số kinh phí thực hiện: 4.960 tr.đ, trong đó:

+ Kính phí hỗ trợ từ SNKH: 4.960 tr.đ.

+ Kinh phí từ các nguồn khác: 0 tr.đ.

b) Tình hình cấp và sử dụng kinh phí từ nguồn SNKH:

STT	***Theo kế hoạch***		***Thực tế đạt được***		***Ghi chú***
	Thời gian (Tháng, năm)	Kinh phí (Tr.đ)	Thời gian (Tháng, năm)	Kinh phí (Tr.đ)	
1	10/07/2018	200	10/07/2018	200	
2	24/10/2018	1.200	24/10/2018	1.200	
3	03/07/2019	1.780	03/07/2019	1.780	
4	10/06/2020	1.780	10/06/2020	1.780	

c) Kết quả sử dụng kinh phí theo các khoản chi:

Đơn vị tính: Triệu đồng

STT	***Nội dung các khoản chi***	***Theo kế hoạch***			***Thực tế đạt được***		
		Tổng	SNKH	Nguồn khác	Tổng	SNKH	Nguồn khác
1	Trả công lao động (khoa học, phổ thông)	2.079,22	2.079,22		2.079,22	2.079,22	
2	Nguyên, vật liệu, năng lượng	1.554	1.554		1.533,63622	1.533,63622	
3	Thiết bị, máy móc	505	505		459,36	459,36	
4	Xây dựng, sửa chữa nhỏ	250	250		249,865	249,865	
5	Chi khác	571,78	571,78		571,78	571,78	
6	Trích quỹ phát triển HĐSN				33,069390	33,069390	
	Tổng cộng	**4.960**	**4.960**		**4.926,93061**	**4.926,93061**	

- Lý do thay đổi:

Nguyên vật liệu, năng lượng: giảm 20.363.780đ *(Hai mươi triệu ba trăm sáu mươi ba nghìn bảy trăm tám mươi đồng)* so với dự toán vì khi thực hiện gói thầu Mua hóa chất vật tư nhà thầu đã chào giá thấp hơn so với dự toán ban đầu.

Thiết bị, máy móc: giảm 45.640.*000đ (Bốn mươi lăm triệu sáu trăm bốn mươi nghìn đồng)* so với dự toán vì khi thực hiện gói thầu Máy móc thiết bị nhà thầu đã chào giá thấp hơn so với dự toán ban đầu.

Xây dựng, sửa chữa nhỏ: giảm 135.000đ *(Một trăm ba mươi lăm nghìn đồng)* so với dự toán vì khi thực hiện gói thầu nhà thầu đã chào giá thấp hơn so với dự toán ban đầu.

Trích quỹ phát triển: tăng 33.069.390đ *(Ba mươi ba triệu không trăm sáu mươi chín nghìn ba trăm chín mươi đồng)* do phần thừa của các khoản không khoán chi được trích lại 50% theo quy định.

3. Các văn bản hành chính trong quá trình thực hiện đề tài:

STT	***Số, thời gian ban hành văn bản***	***Tên văn bản***	***Ghi chú***
1	Số 19/QĐ-VHL ngày 08/01/2018	Quyết định thành lập Hội đồng tư vấn tuyển chọn tổ chức và cá nhân thực hiện đề tài KH&CN cấp quốc gia thuộc Chương trình Tây Nguyên 2016 - 2020 bắt đầu thực hiện từ năm 2018. Lĩnh vực: Khoa học tự nhiên.	
2	Số 486/QĐ-VHL ngày 30/3/2018	Quyết định Phê duyệt tổ chức chủ trì, cá nhân chủ nhiệm, kinh phí, phương thức khoán chi và thời gian thực hiện các đề tài khoa học và công nghệ cấp quốc gia thuộc Chương trình Tây Nguyên 2016 - 2020 bắt đầu thực hiện từ năm 2018.	
3	Số 16/2018/HĐ-TN18/T08-KHCN-TN/16-20 ngày 30/6/2018	Hợp đồng thực hiện đề tài Khoa học và Công nghệ.	
4	Số 1350/QĐ-VHL ngày 07/9/2020	Quyết định gia hạn thời gian thực hiện đề tài mã số TN18/T08 thuộc Chương trình Tây Nguyên 2016 – 2020.	

4. Tổ chức phối hợp thực hiện đề tài, dự án:

TT	*Tên tổ chức đăng ký theo Thuyết minh*	*Tên tổ chức đã tham gia thực hiện*	*Nội dung tham gia chủ yếu*	*Sản phẩm chủ yếu đạt được*	*Ghi chú*
11	Trường Đại học Đà Lạt	Trường Đại học Đà Lạt	- Điều tra thu thập, khảo sát các đặc điểm sinh học của 05 loài lan. - Nghiên cứu nhân giống sinh dưỡng 05 loài lan.	- Báo cáo kết quả tra thu thập, khảo sát các đặc điểm sinh học của 05 loài lan. - Báo cáo kết quả nhân giống sinh dưỡng 05 loài lan.	
22	Khu du lịch hồ Tuyền Lâm	Khu du lịch hồ Tuyền Lâm	- Xây dựng mô hình trồng lan bán hoang dã tại Khu du lịch Hồ Tuyền Lâm trên diện tích 1.000m^2 dưới tán rừng tự nhiên, số lượng 8.000 cây.	- Xây dựng mô hình trồng lan bán hoang dã tại Khu du lịch Hồ Tuyền Lâm trên diện tích 1.000m^2 dưới tán rừng tự nhiên, số lượng 8.000 cây.	
.3	Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà	Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà	- Xây dựng mô hình trồng lan bán hoang dã tại Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà trên diện tích 1.000m^2 dưới tán rừng tự nhiên, số lượng 8.000 cây.	- Xây dựng mô hình trồng lan bán hoang dã tại Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà trên diện tích 1.000m^2 dưới tán rừng tự nhiên, số lượng 8.000 cây.	

5. Cá nhân tham gia thực hiện đề tài:

TTT	*Tên cá nhân đăng ký theo Thuyết minh*	*Tên cá nhân đã tham gia thực hiện*	*Nội dung tham gia chính*	*Sản phẩm chủ yếu đạt được*	*Ghi chú*
11	TS. Nông Văn Duy	TS. Nông Văn Duy	Chủ nhiệm đề tài, chịu trách nhiệm chung về các nội dung đề tài.	Đã tổ chức thực hiện tốt các nội dung, hoạt động đề tài.	
22	ThS. Nguyễn Thị Thanh Hằng	ThS. Nguyễn Thị Thanh Hằng	Nghiên cứu nhân giống *in vitro*, nghiên cứu quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau ống nghiệm và cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã.	Cây con *in vitro* và các quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau ống nghiệm và cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã.	
.3	ThS. H' Yon Niê Bing	ThS. H' Yon Niê Bing	Nghiên cứu nhân giống *in vitro*, nghiên cứu quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau ống nghiệm và cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã.	Cây con *in vitro* và các quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau ống nghiệm và cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã.	
4	ThS. Vũ Kim Công	ThS. Vũ Kim Công	Nghiên cứu nhân giống *in vitro*, nghiên cứu quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau ống nghiệm và cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã.	Cây con *in vitro* và các quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau ống nghiệm và cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã.	
5	ThS. Quách Văn Hợi	ThS. Quách Văn Hợi	Nghiên cứu nhân giống *in vitro*, nghiên cứu quy trình kỹ thuật chăm	Cây con *in vitro* và các quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau	

			sóc cây con sau ống nghiệm và cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã.	ống nghiệm và cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã.	
6	ThS. Đặng Thị Thắm	ThS. Đặng Thị Thắm	Nghiên cứu nhân giống *in vitro*, nghiên cứu quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau ống nghiệm và cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã.	Cây con *in vitro* và các quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau ống nghiệm và cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã.	
7	ThS. Trần Thái Vinh	ThS. Trần Thái Vinh	Nghiên cứu nhân giống *in vitro*, nghiên cứu quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau ống nghiệm và cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã.	Cây con *in vitro* và các quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau ống nghiệm và cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã.	
8	PGS.TS. Nguyễn Văn Kết		Thu thập nguồn gen và nghiên cứu bổ sung một số đặc điểm sinh thái học của các loài lan của đề tài. Nhân giống sinh dưỡng.		
9	PGS. TS. Trần Văn Tiến	PGS.TS. Trần Văn Tiến	Thu thập nguồn gen và nghiên cứu bổ sung một số đặc điểm sinh thái học của các loài lan của đề tài. Nhân giống sinh dưỡng.	Nguồn mẫu phục vụ cho công tác nhân giống, bảo tồn và cây con từ nhân giống sinh dưỡng.	
10	TS. Lê Ngọc Triệu	TS. Lê Ngọc Triệu	Thu thập nguồn gen và nghiên cứu bổ sung một số đặc	Nguồn mẫu phục vụ cho công tác nhân giống, bảo	

			điểm sinh thái học của các loài lan của đề tài. Nhân giống sinh dưỡng.	tồn và cây con từ nhân giống sinh dưỡng.	
11	ThS. Đinh Văn Khiêm	ThS. Đinh Văn Khiêm	Thu thập nguồn gen và nghiên cứu bổ sung một số đặc điểm sinh thái học của các loài lan của đề tài. Nhân giống sinh dưỡng.	Nguồn mẫu phục vụ cho công tác nhân giống, bảo tồn và cây con từ nhân giống sinh dưỡng.	
12	ThS. Lê Văn Sơn	ThS. Lê Văn Sơn	Thu thập nguồn gen và nghiên cứu bổ sung một số đặc điểm sinh thái học của các loài lan của đề tài. Nhân giống sinh dưỡng.	Nguồn mẫu phục vụ cho công tác nhân giống, bảo tồn và cây con từ nhân giống sinh dưỡng.	
13	ThS. Ngô Tuấn Cường	ThS. Ngô Tuấn Cường	Xây dựng mô hình trồng lan bán hoang dã.	Mô hình trồng lan bán hoang dã.	
14	CN. Vũ Đình Cường	CN. Vũ Đình Cường	Thu thập nguồn gen và nghiên cứu bổ sung một số đặc điểm sinh thái học của các loài lan của đề tài. Nhân giống sinh dưỡng.	Nguồn mẫu phục vụ cho công tác nhân giống, bảo tồn và cây con từ nhân giống sinh dưỡng.	
15	ThS. Nguyễn Thị Phượng Hoàng	ThS. Nguyễn Thị Phượng Hoàng	Nghiên cứu nhân giống *in vitro*, nghiên cứu quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau ống nghiệm và cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã.	Cây con *in vitro* và các quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau ống nghiệm và cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã.	

- Lý do thay đổi:

PGS. TS. Nguyễn Văn Kết vì không sắp xếp được thời gian nên không tham gia các nội dung nghiên cứu của đề tài.

ThS. Quách Văn Hợi: đi học ở Nga nên tham gia các nội dung nghiên cứu từ tháng 7/2018 - 9/2019.

ThS. Nguyễn Thị Phượng Hoàng: Tham gia các nội dung công việc của ThS. Quách Văn Hợi từ tháng 9/2019 đến khi kết thúc đề tài.

6. Tình hình hợp tác quốc tế:

STT	*Theo kế hoạch*	*Thực tế đạt được*	*Ghi chú**

- Lý do thay đổi (nếu có):

7. Tình hình tổ chức hội thảo, hội nghị:

STT	*Theo kế hoạch*	*Thực tế đạt được*	*Ghi chú**

- Lý do thay đổi (nếu có):

8. Tóm tắt các nội dung, công việc chủ yếu:

STT	*Các nội dung, công việc chủ yếu*	*Thời gian*		*Người, cơ quan thực hiện*
		Theo kế hoạch	Thực tế đạt được	
11	Thu thập thông tin: Điều tra hiện trạng địa điểm xây dựng mô hình; thu thập, khảo sát một số đặc điểm sinh thái học của 05 loài lan (*Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis và Phaius tankervilleae)*	7/2018-9/2019	7/2018-9/2019	Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Trường ĐH Đà Lạt, VQG Bidoup - Núi Bà.
2	Nghiên cứu các biện pháp nhân giống 05 loài Lan (*Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis và Phaius tankervilleae)*	7/2018 - 12/2019	7/2018 - 12/2019	Viện NC Khoa học Tây Nguyên, Trường ĐH Đà Lạt, VQG Bidoup - Núi Bà.
3	Tiến hành thí nghiệm, hoàn thiện quy trình: Nghiên cứu quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau ống nghiệm và các biện pháp kỹ thuật chăm sóc cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã, dưới tán rừng tự nhiên	3/2019 - 10/2020	3/2019 - 10/2020	Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên

4	Đề xuất mô hình trồng lan bán hoang dã	6/2019 - 8/2020	6/2019 - 8/2020	Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Khu du lịch Hồ Tuyền Lâm, VQG Bidoup - Núi Bà

III. SẢN PHẨM KH&CN CỦA ĐỀ TÀI, DỰ ÁN

1. Sản phẩm KH&CN đã tạo ra:

a) Sản phẩm Dạng I:

STT	***Tên sản phẩm và chỉ tiêu chất lượng chủ yếu***	***Đơn vị đo***	***Số lượng***	***Theo kế hoạch***	***Thực tế đạt được***
1	Xây dựng 03 mô hình trồng lan bán hoang dại tại 3 điểm: Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên (500m^2 dưới tán cây của vườn thực vật, 4.000 cây), Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà (1.000m^2 tán rừng tự nhiên, 8.000 cây) và dự án khu du lịch hồ Tuyền Lâm (1.000m^2 dưới tán rừng tự nhiên, 8.000 cây)	Mô hình	03	03	03
2	Sản phẩm nhân giống 5 loài với 20 ngàn cây lan	Cây con	20.000	20.000	25.000

b) Sản phẩm Dạng II:

STT	***Tên sản phẩm***	***Yêu cầu khoa học cần đạt***		***Ghi chú***
		Theo kế hoạch	Thực tế đạt được	
1	Báo cáo Khoa học	01	01	
2	Quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau ống nghiệm	Xây dựng được các nhóm quy trình kỹ thuật đối với các loài thuộc chi *Dendrobium, Paphiopedilum* và *Phaius.*	- 01 quy trình kỹ thuật đối với các loài thuộc chi *Dendrobium.* - 01 quy trình kỹ thuật đối với các loài thuộc chi	

			Paphiopedilum và *Phaius.*	
3	Quy trình kỹ thuật chăm sóc cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dại, tán rừng tự nhiên	Xây dựng được các nhóm quy trình kỹ thuật đối với các loài thuộc chi *Dendrobium, Paphiopedilum* và *Phaius.*	- 01 quy trình kỹ thuật đối với các loài thuộc chi *Dendrobium.* - 01 quy trình kỹ thuật đối với các loài thuộc chi *Paphiopedilum* và *Phaius.*	

c) Sản phẩm Dạng III:

STT	***Tên sản phẩm***	***Yêu cầu khoa học cần đạt***		***Số lượng, nơi công bố*** *(Tạp chí, nhà xuất bản)*
		Theo kế hoạch	Thực tế đạt được	
1	Công bố bài báo	01 tạp chí quốc tế; 02 tạp chí quốc gia	01 tạp chí quốc tế; 02 tạp chí quốc gia	*Phytotaxa* 369 (1): 001 - 014. 2018 Journal of Biotechnology 16(4): 1-9, 2018 Tạp chí Công nghệ Sinh học 19(1): 155-163, 2021
2	Sách chuyên khảo về lan Tây Nguyên	01	01 bản thảo	

d) Kết quả đào tạo:

STT	***Cấp đào tạo, Chuyên ngành đào tạo***	***Số lượng***		***Ghi chú*** *(Thời gian kết thúc)*
		Theo kế hoạch	Thực tế đạt được	
1	Thạc sỹ	**02**	**02**	

đ) Tình hình đăng ký bảo hộ quyền sở hữu công nghiệp, quyền đối với giống cây trồng:

STT	***Tên sản phẩm đăng ký***	***Kết quả***		***Ghi chú***
		Theo kế hoạch	Thực tế đạt được	

e) Thống kê danh mục sản phẩm KHCN đã được ứng dụng vào thực tế

STT	*Tên kết quả đã được ứng dụng*	*Thời gian*	*Địa điểm*	*Kết quả sơ bộ*

2. Đánh giá về hiệu quả do đề tài, dự án mang lại:

a) Hiệu quả về khoa học và công nghệ:

Những kết quả nghiên cứu của đề tài đã góp phần cung cấp những dẫn liệu chính xác nhất về đặc điểm hình thái, sinh thái, phân bố... của 05 loài lan (*Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis và Phaius tankervilleae*) đặc hữu, quý hiếm và có giá trị kinh tế cao.

Đề tài đã hoàn thiện quy trình nhân giống, quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau ống nghiệm và quy trình kỹ thuật chăm sóc cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dại, tán rừng tự nhiên của 05 loài lan.

Việc xây dựng 03 mô hình trồng lan bán hoang dã sẽ góp phần phục vụ du lịch sinh thái, đem lại hiệu quả kinh tế và góp phần nâng cao ý thức cho người dân trong việc bảo tồn nguồn gen quý tại địa phương.

Sách chuyên khảo về Lan rừng Tây Nguyên sẽ là nguồn tài liệu khoa học phục vụ cho việc học tập và nghiên cứu về họ Lan ở Tây Nguyên và Việt Nam.

Đề tài đã phát hiện và công bố 01 loài lan mới cho khoa học, điều này chứng tỏ được tính đa dạng của họ Lan ở nước ta là còn rất lớn.

Kết quả nhân giống, trồng thử nghiệm thành công các loài Lan có giá trị kinh tế cao ở các mô hình khác nhau đã mở ra một hướng mới bảo tồn và phát triển các giá trị tài nguyên sinh vật đặc hữu của Tây Nguyên. Các mô hình được xây dựng hoàn toàn có điều kiện phát triển mở rộng cho nhiều vùng ở Tây Nguyên, chẳng những có thể bù đắp các thiếu hụt do khai thác quá mức nguồn tài nguyên họ Lan mà còn tạo điều kiện cho phát triển thành mặt hàng xuất khẩu có giá trị.

b) Hiệu quả về kinh tế xã hội:

Kết quả của việc nghiên cứu nhân giống 05 loài lan đặc hữu, quý hiếm, có giá trị kinh tế cao sẽ góp phần tạo ra nguồn cây con với số lượng lớn, kết hợp với các biện pháp chăm sóc cây sau ống nghiệm và chăm sóc cây trưởng thành với điều kiện bán hoang dại, tán rừng tự nhiên hiệu quả sẽ mang lại những hiệu quả kinh tế xã hội rất lớn cho vùng Tây Nguyên.

Đồng thời, việc xây dựng các mô hình trồng lan bán hoang dã sẽ tạo nên một sản phẩm du lịch sinh thái mới về hoa lan, góp phần thu hút khách du lịch đến với Lâm Đồng - Tây Nguyên nhằm phát triển hơn cho ngành dịch vụ của địa phương.

Việc hoàn thiện quy trình nhân giống, quy trình chăm sóc cây sau ống nghiệm và quy trình kỹ thuật chăm sóc cây trưởng thành với điều kiện bán hoang

dã, tán rừng tự nhiên của 05 loài lan đã góp phần bảo tồn có hiệu quả nguồn gen của các loài lan đặc hữu, quý hiếm và có giá trị kinh tế.

Đề tài đã góp phần nâng cao năng lực về trình độ khoa học và khả năng tổ chức thực hiện đề tài của các cán bộ khoa học, tiếp cận được với những tiến bộ khoa học kỹ thuật mới trong và ngoài nước, có điều kiện hơn trong việc hội nhập quốc tế và tăng cường sự hợp tác khoa học kỹ thuật của các tổ chức khoa học trong và ngoài nước.

Đề tài đã hỗ trợ đào tạo 02 thạc sĩ, góp phần tạo nguồn nhân lực khoa học có chất lượng cho địa phương.

Việc xây dựng các mô hình trồng lan sẽ giúp người dân và du khách hiểu rõ hơn về tầm quan trọng của những loài lan đặc hữu, quý hiếm, nâng cao nhận thức của người dân trong việc bảo tồn, khai thác và phát triển các nguồn lan rừng đặc hữu, quý hiếm và có giá trị kinh tế cao.

3. Tình hình thực hiện chế độ báo cáo, kiểm tra của đề tài, dự án:

STT	*Nội dung*	*Thời gian thực hiện*	*Ghi chú*
I	**Báo cáo định kỳ**		
1	Lần 1	23/10/2018	Đạt tiến độ
2	Lần 2	20/06/2019	Đạt tiến độ
3	Lần 3	01/06/2020	Đạt tiến độ
4	Lần 4	07/12/2020	Đạt tiến độ
5	Lần 5	14/4/2021	Đạt tiến độ
II	**Kiểm tra định kỳ**		
1	Lần 1	23/10/2018	Đạt tiến độ
2	Lần 2	20/06/2019	Đạt tiến độ
3	Lần 3	01/06/2020	Đạt tiến độ
4	Lần 4	07/12/2020	Đạt tiến độ
5	Lần 5	14/4/2021	Đạt tiến độ
III	**Nghiệm thu cơ sở**	26/3/2021	Xếp loại Đạt
IV	**Nghiệm thu Nhà nước**	29/6/2021	Xếp loại Đạt

Chủ nhiệm đề tài

Nông Văn Duy

Tổ chức chủ trì đề tài

VIỆN NGHIÊN CỨU KHOA HỌC TÂY NGUYÊN

Nguyễn Hữu Toàn Phan

MỤC LỤC

DANH MỤC HÌNH ẢNH v
DANH MỤC BẢNG ix
BẢNG PHỤ LỤC MÔI TRƯỜNG xii
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT xiii
MỞ ĐẦU 1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU 3
1.1. Đặc điểm hình thái của họ Lan 3
1.2. Tổng quan về tình hình nghiên cứu nhân giống chi Hoàng thảo *(Dendrobium)*, Lan hài *(Paphiopedilum)* và Hạc đính *(Phaius)* 4
1.2.1. Tình hình nghiên cứu nhân giống chi Hoàng thảo 4
1.2.1.1. Trên thế giới 4
1.2.1.2. Ở Việt Nam 5
1.2.2. Tình hình nghiên cứu nhân giống chi Lan Hài 6
1.2.2.1. Trên thế giới 7
1.2.2.2. Ở Việt Nam 8
1.2.3. Tình hình nghiên cứu nhân giống chi Hạc đính 8
1.3. Đặc điểm tự nhiên khu vực nghiên cứu - Cao nguyên Đà Lạt 10
1.3.1. Vị trí địa lý và địa hình 10
1.3.2. Nhiệt độ 10
1.3.3. Độ ẩm 11
1.3.4. Ánh sáng 11
1.3.5. Chế độ gió 11
1.3.6. Thảm thực vật 12
1.4. Nhân giống lan 14
1.4.1. Nhân giống sinh dưỡng 14
1.4.1.1. Tách bụi 14
1.4.1.2. Nhân giống lan bằng thân hành giả 14
1.4.1.3. Nhân giống bằng tách nhánh 15
1.4.2. Nhân giống trong ống nghiệm (*in vitro*) 15
1.4.2.1. Các bước nhân giống *in vitro* 15

1.4.2.2. Môi trường dinh dưỡng trong nhân giống *in vitro* 16
1.4.2.3. Các chất điều hoà sinh trưởng 17
1.4.2.4. PLB (Protocorms - like body) 18
1.5. Một số yếu tố ảnh hưởng tới sinh trưởng của cây con ở giai đoạn vườn ươm 19
1.5.1. Ánh sáng và nhiệt độ 19
1.5.2. Độ ẩm 19
1.5.3. Giá thể 20
1.5.4. Dinh dưỡng 20
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 22
2.1. Đối tượng và nội dung nghiên cứu 22
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu 22
2.1.2. Nội dung nghiên cứu 22
2.2. Phương pháp nghiên cứu 22
2.2.1. Phương pháp cho nội dung 1: Điều tra hiện trạng địa điểm xây dựng mô hình; thu thập, khảo sát một số đặc điểm sinh thái học của 05 loài Lan (*Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis và Phaius tankervilleae*) 22
2.2.2. Phương pháp cho nội dung 2: Nghiên cứu các biện pháp nhân giống 05 loài Lan (*Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis và Phaius tankervilleae*) 23
2.2.2.1. Thí nghiệm các biện pháp nhân giống sinh dưỡng 05 loài Lan (*Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis và Phaius tankervilleae*) 23
2.2.2.2. Thí nghiệm nhân giống vô tính bằng phương pháp nuôi cấy mô 05 loài Lan (*Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis và Phaius tankervilleae*) 24
2.2.3. Phương pháp cho nội dung 3: Nghiên cứu quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau ống nghiệm và các biện pháp kỹ thuật chăm sóc cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã, dưới tán rừng tự nhiên. 28
2.2.4. Phương pháp cho nội dung 4: Xây dựng mô hình trồng lan bán hoang dã 29
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN 30

3.1. Kết quả khảo sát địa điểm xây dựng mô hình và đặc điểm sinh thái của 05 loài Lan (*Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis và Phaius tankervilleae*) 30
3.1.1. Mô hình tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên 30
3.1.2. Mô hình tại Khu du lịch hồ Tuyền Lâm 32
3.1.3. Mô hình tại Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà 34
3.1.4. Đặc điểm hình thái và sinh thái của các loài lan nghiên cứu 36
3.1.4.1. *Dendrobium nobile* Lindl. Gen. Sp. Orchid. Pl. 79 1830 36
3.1.4.2. *Dendrobium trankimianum* T. Yukawa. Ann. Tsukuba Bot. Gard. 23: 21 2004 37
3.1.4.3. *Paphiopedilum villosum* (Lindl.) Stein. Orchid. - Buch 490 1892 38
3.1.4.4. *Phaius baolocensis* V. D. Nong, T. Chen & X. D. Zhang. Adansonia 34 (2): 251 - 255 2012 40
3.1.4.5. *Phaius tankervilleae* (Banks) Blume. Mus. Bot. 2: 177 1856 41
3.2. Kết quả nhân giống 05 loài Lan (*Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis và Phaius tankervilleae*) 43
3.2.1. Nhân giống sinh dưỡng 43
3.2.1.1. Nhân giống sinh dưỡng Hoàng thảo dẹt và Hoàng thảo trần kim 43
3.2.1.2. Nhân giống sinh dưỡng Lan Hài vàng 46
3.2.1.3. Nhân giống sinh dưỡng Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu 48
3.2.2. Nhân giống *in vitro* 50
3.2.2.1. Nghiên cứu phương pháp khử trùng chồi ngủ 50
3.2.2.2. Ảnh hưởng của tuổi quả đến khả năng nảy mầm in vitro của hạt Lan Hài vàng trên môi trường MS 51
3.2.2.3. Ảnh hưởng của tuổi quả đến khả năng nảy mầm in vitro của hạt Lan Hài vàng trên nền môi trường ½MS 52
3.2.2.4. Ảnh hưởng của tuổi quả đến khả năng nảy mầm in vitro của hạt Lan Hài vàng trên nền môi trường VW 53
3.2.2.5. Một số yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của Hoàng thảo trần kim trong nuôi cấy *in vitro* 54
3.2.2.6. Một số yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của Hoàng thảo dẹt trong nuôi cấy *in vitro* 65
3.2.2.7. Một số yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của Lan Hài vàng trong nuôi cấy *in vitro* 74

3.2.2.8. Một số yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu trong nuôi cấy *in vitro* 76

3.3. Quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau ống nghiệm và các biện pháp chăm sóc cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã, tán rừng tự nhiên 89

3.3.1. Một số yếu tố ảnh hưởng tới sự sinh trưởng và phát triển của cây con sau ống nghiệm 89

3.3.1.1. Hoàng thảo trần kim và Hoàng thảo dẹt 90

3.3.1.2. Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu 99

3.3.1.3. Lan Hài vàng 107

3.3.1.4. Quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau ống nghiệm 114

3.3.2. Quy trình kỹ thuật chăm sóc cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã, tán rừng tự nhiên 119

3.3.2.1. Quy trình kỹ thuật chăm sóc cây *D. nobile* và *D. trankimianum* trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã, tán rừng tự nhiên .. 119

3.3.2.2 Quy trình kỹ thuật chăm sóc cây *Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis* và *Phaius tankervilleae* trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã, tán rừng tự nhiên 123

3.4. Xây dựng mô hình trồng lan bán hoang dã 127

3.4.1. Các bước triển khai xây dựng mô hình 127

3.4.1.1. Xử lý thực bì 127

3.4.1.2. Làm đất, đào hố, bón phân 127

3.4.1.3. Tiêu chuẩn cây xuất vườn 128

3.4.1.4. Bốc xếp vận chuyển và kỹ thuật trồng 133

3.4.2. Kết quả xây dựng mô hình 133

3.4.2.1. Mô hình tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên 133

3.4.2.2. Mô hình tại Khu du lịch Hồ Tuyền Lâm 140

3.4.2.3. Mô hình tại Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà 144

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 154

TÀI LIỆU THAM KHẢO 158

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 3.1. Địa điểm và thảm thực vật khu vực triển khai mô hình tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên..... 31

Hình 3.2. Địa điểm và thảm thực vật khu vực triển khai mô hình tại Khu du lịch Hồ Tuyền Lâm 33

Hình 3.3. Địa điểm và thảm thực vật khu vực triển khai mô hình tại Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà 35

Hình 3.4. Hoàng thảo dẹt - *Dendrobium nobile* Lindl. 37

Hình 3.5. Hoàng thảo trần kim - *Dendrobium trankimianum* T. Yukawa..... 38

Hình 3.6. Lan Hài vàng - *Paphiopedilum villosum* (Lindl.) Stein. 40

Hình 3.7. Hạc đính bảo lộc - *Phaius baolocensis* V. D. Nong, T. Chen & X. D. Zhang. 41

Hình 3.8. Hạc đính nâu - *Phaius tankervilleae* (Banks) Blume. 43

Hình 3.9. Hoàng thảo dẹt ươm kie nảy chồi. 45

Hình 3.10. Hoàng thảo trần kim ươm kie nảy chồi..... 46

Hình 3.11. Tách cây Lan Hài vàng 48

Hình 3.12. Nhân giống bằng cuống hoa cây Hạc đính 49

Hình 3.13. Vào mẫu chồi Hoàng thảo trần kim 51

Hình 3.14. Lan Hài vàng nảy mầm sau khi gieo hạt 90 ngày, 120 ngày. 52

Hình 3.15. Ảnh hưởng của BA đến khả năng hình thành PLB của Hoàng thảo trần kim. 55

Hình 3.16. Ảnh hưởng của BA kết hợp NAA đến khả năng hình thành PLB của Hoàng thảo trần kim 56

Hình 3.17. Ảnh hưởng của TDZ kết hợp NAA đến khả năng hình thành PLB của Hoàng thảo trần kim 58

Hình 3.18. Ảnh hưởng của nồng độ nước dừa đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro* Hoàng thảo trần kim..... 59

Hình 3.19. Ảnh hưởng của BA đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro* Hoàng thảo trần kim. 60

Hình 3.20. Ảnh hưởng của hàm lượng dịch nghiền củ, quả đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro* Hoàng thảo trần kim..... 62

Hình 3.21. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng tái sinh rễ *in vitro* Hoàng thảo trần kim..... 63

Hình 3.22. Ảnh hưởng của các IAA, IBA, NAA đến khả năng tái sinh rễ *in vitro* của Hoàng thảo trần kim 65

Hình 3.23. Ảnh hưởng của BA và NAA đến quá trình hình thành PLB của Hoàng thảo dẹt. 67

Hình 3.24. Ảnh hưởng của TDZ và NAA đến quá trình hình thành PLB của Hoàng thảo dẹt sau 45 ngày. 68

Hình 3.25. Ảnh hưởng của hàm lượng BA đến sự hình thành và phát triển của chồi cây Hoàng thảo dẹt 70

Hình 3.26. Ảnh hưởng của Kin đến sự hình thành và phát triển của chồi cây Hoàng thảo dẹt ở các nồng độ khác nhau 71

Hình 3.27. Ảnh hưởng của hàm lượng dịch nghiền củ, quả đến sự hình thành và phát triển của chồi cây Hoàng thảo dẹt *in vitro* 72

Hình 3.28. Sự hình thành rễ của chồi Hoàng thảo dẹt ở các nồng độ chất kích thích IAA, IBA, NAA 73

Hình 3.29. Sự hình thành rễ của chồi Lan Hài vàng ở các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau 76

Hình 3.30. Ảnh hưởng của BA kết hợp NAA đến hình thành PLB loài Hạc đính nâu 78

Hình 3.31. Ảnh hưởng của TDZ kết hợp NAA đến hình thành PLB loài Hạc đính nâu 80

Hình 3.32. Ảnh hưởng của hàm lượng BA đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro* Hạc đính bảo lộc 81

Hình 3.33. Ảnh hưởng của Kin đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro* Hạc đính bảo lộc 82

Hình 3.34. Ảnh hưởng của BA kết hợp Kin đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro* Hạc đính nâu 84

Hình 3.35. Ảnh hưởng của hàm lượng dịch nghiền củ, quả đến sự hình thành và phát triển của chồi cây Hạc đính bảo lộc *in vitro* 85

Hình 3.36. Ảnh hưởng của dịch nghiền củ, quả đến sự hình thành và phát triển của chồi cây Hạc đính nâu *in vitro* 86

Hình 3.37. Sự hình thành rễ của chồi Hạc đính bảo lộc ở các nồng độ khác nhau 88

Hình 3.38. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng (IAA, IBA, NAA) đến khả năng tái sinh rễ ở Hạc đính nâu trong nuôi cấy *in vitro* 89

Hình 3.39. Ảnh hưởng của giá thể tới cây Hoàng thảo trần kim *in vitro* trong giai đoạn vườn ươm 92

Hình 3.40. Hoàng thảo dẹt trồng trên giá thể dớn mút 92
Hình 3.41. Ảnh hưởng của phân bón lá tới cây Hoàng thảo trần kim *in vitro* trong giai đoạn vườn ươm 94
Hình 3.42. Cây con Hoàng thảo dẹt ở các chế độ che sáng khác nhau..... 97
Hình 3.43. Cây con Hoàng thảo dẹt ở các độ ẩm khác nhau 98
Hình 3.44. Cây con Hạc đính bảo lộc trồng trên giá thể dớn mút 100
Hình 3.45. Cây con Hạc đính nâu trồng trên giá thể dớn mút 100
Hình 3.46. Cây con Hạc đính bảo lộc ở nghiệm thức phun đạm cá 102
Hình 3.47. Cây con Hạc đính nâu ở nghiệm thức phun Nitrophoska Foliar 103
Hình 3.48. Cây con Hạc đính nâu ở độ che sáng 60% - 70%. 105
Hình 3.49. Cây con Lan Hài vàng trồng trên các giá thể khác nhau 108
Hình 3.50. Cây con Lan Hài vàng ở các loại chế phẩm dinh dưỡng khác nhau. 110
Hình 3.51. Cây con Lan Hài vàng ở các độ tàn che khác nhau 111
Hình 3.52. Cây con Lan Hài vàng ở độ che sáng 70% - 80%..... 112
Hình 3.53. Cây con Lan Hài vàng ở độ che sáng 60% - 70%..... 112
Hình 3.54. Cây con Lan Hài vàng ở các chế độ nước tưới khác nhau..... 114
Hình 3.55. Cây Hoàng thảo trần kim khi xuất vườn..... 128
Hình 3.56. Cây Hoàng thảo dẹt khi xuất vườn 129
Hình 3.57. Cây Lan Hài vàng khi xuất vườn. 130
Hình 3.58. Cây Hạc đính bảo lộc khi xuất vườn..... 131
Hình 3.59. Cây Hạc đính nâu khi xuất vườn..... 132
Hình 3.60. Loài *Dendrobium trankimianum*..... 134
Hình 3.61. Loài *Dendrobium trankimianum*..... 135
Hình 3.62. Loài *Dendrobium nobile* 136
Hình 3.63. Loài *Paphiopedilum villosum* 137
Hình 3.64. Loài *Phaius baolocensis* 138
Hình 3.65. Loài *Phaius tankervilleae* 139
Hình 3.66. Loài *Dendrobium trankimianum*..... 140
Hình 3.67. Loài *Dendrobium nobile* 141
Hình 3.68. Loài *Paphiopedilum villosum* 142
Hình 3.69. Loài *Phaius baolocensis* và loài *Phaius tankervilleae* 143

Hình 3.70. Loài *Dendrobium trankimianum* 144
Hình 3.71. Loài *Dendrobium nobile* 145
Hình 3.72. Loài *Paphiopedilum villosum* 146
Hình 3.73. Loài *Phaius baolocensis* và loài *Phaius tankervilleae* 147
Hình 3.74. Vườn thực nghiệm Bidoup - Núi Bà 148
Hình 3.75. Mô hình trồng lan bán hoang dã. 150
Hình 3.76. Bệnh trên loài Hoàng thảo trần kim và Hoàng thảo dẹt 151
Hình 3.77. Bệnh trên loài Lan Hài vàng. 152
Hình 3.78. Bệnh trên loài Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu 153

DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng nảy chồi Hoàng thảo dẹt và Hoàng thảo trần kim..... 44

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của phương pháp nhân giống tách bụi và tách cây đến khả năng nảy chồi loài Lan Hài vàng..... 47

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của phương pháp nhân giống ươm cuống hoa và tách củ đến khả năng nảy chồi loài Hạc đính. 49

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của phương pháp khử trùng đến khả năng sống, vô trùng của chồi lan (sau 8 tuần)..... 50

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của tuổi quả đến tỷ lệ nảy mầm của hạt Lan Hài vàng trên môi trường MS 51

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của tuổi quả đến tỷ lệ nảy mầm của hạt Lan Hài vàng trên nền môi trường ½MS. 53

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của tuổi quả đến tỷ lệ nảy mầm của hạt Lan Hài vàng trên nền môi trường VW. 54

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của BA đến khả năng hình thành PLB Hoàng thảo trần kim 55

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của BA kết hợp NAA đến khả năng hình thành PLB Hoàng thảo trần kim..... 56

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của TDZ kết hợp NAA đến khả năng hình thành PLB Hoàng thảo trần kim..... 57

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của nồng độ nước dừa đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro* Hoàng thảo trần kim..... 58

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của hàm lượng BA đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro* Hoàng thảo trần kim..... 60

Bảng 3.13. Ảnh hưởng của dịch nghiền khoai tây, chuối chín, cà rốt đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro* Hoàng thảo trần kim. 61

Bảng 3.14. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng tái sinh rễ *in vitro* Hoàng thảo trần kim..... 63

Bảng 3.15. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng (IAA, IBA, NAA) đến khả năng tái sinh rễ *in vitro* Hoàng thảo trần kim..... 64

Bảng 3.16. Ảnh hưởng của BA và NAA đến quá trình hình thành PLB Hoàng thảo dẹt. 66

Bảng 3.17. Ảnh hưởng của TDZ và NAA đến quá trình hình thành PLB Hoàng thảo dẹt 67

Bảng 3.18. Ảnh hưởng của hàm lượng BA đến sự hình thành và phát triển của chồi cây Hoàng thảo dẹt 69
Bảng 3.19. Ảnh hưởng của Kin đến sự hình thành và phát triển của chồi cây Hoàng thảo dẹt. 70
Bảng 3.20. Ảnh hưởng của hàm lượng dịch nghiền củ, quả đến sự hình thành và phát triển của chồi cây Hoàng thảo dẹt 71
Bảng 3.21. Ảnh hưởng của IAA, IBA, NAA lên sự hình thành rễ Hoàng thảo dẹt. 72
Bảng 3.22. Ảnh hưởng của dịch chiết khoai tây, cà rốt và chuối đến khả năng hình thành và phát triển của chồi cây Lan Hài vàng 74
Bảng 3.23. Ảnh hưởng của IAA, IBA, NAA lên sự ra rễ của loài Lan Hài vàng. 75
Bảng 3.24. Ảnh hưởng của BA đến hình thành PLB Hạc đính bảo lộc 76
Bảng 3.25. Ảnh hưởng của BA kết hợp NAA đến hình thành PLB Hạc đỉnh bảo lộc và Hạc đính nâu 77
Bảng 3.26. Ảnh hưởng của TDZ kết hợp NAA đến hình thành PLB Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu 79
Bảng 3.27. Ảnh hưởng của hàm lượng BA đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro* Hạc đính bảo lộc. 81
Bảng 3.28. Ảnh hưởng của Kin đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro* Hạc đính bảo lộc. 82
Bảng 3.29. Ảnh hưởng của hàm lượng BA kết hợp Kin đến sự hình thành và phát triển chồi Hạc đính nâu. 83
Bảng 3.30. Ảnh hưởng của hàm lượng dịch nghiền củ, quả đến sự hình thành và phát triển chồi Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu. 84
Bảng 3.31. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng (IBA, NAA, IAA) đến khả năng tái sinh rễ Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu 86
Bảng 3.32. Ảnh hưởng của giá thể tới cây lan Hoàng thảo trần kim và Hoàng thảo dẹt trong giai đoạn vườn ươm 90
Bảng 3.33. Ảnh hưởng của các loại phân bón lá tới cây Hoàng thảo trần kim *in vitro* trong giai đoạn vườn ươm 93
Bảng 3.34. Ảnh hưởng của các loại phân bón lá tới cây Hoàng thảo dẹt *in vitro* trong giai đoạn vườn ươm 95
Bảng 3.35. Ảnh hưởng của độ che sáng đến sinh trưởng cây con Hoàng thảo dẹt và Hoàng thảo trần kim trong giai đoạn vườn ươm 96

Bảng 3.36. Ảnh hưởng của độ ẩm đến sinh trưởng cây con Hoàng thảo dẹt và Hoàng thảo trần kim trong giai đoạn vườn ươm 97

Bảng 3.37. Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống và hình thái cây con *in vitro* Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu trong giai đoạn vườn ươm 99

Bảng 3.38. Ảnh hưởng của các loại phân bón đến tỷ lệ sống và phát triển cây con Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu trong giai đoạn vườn ươm 101

Bảng 3.39. Ảnh hưởng của chế độ che sáng đến sinh trưởng cây con Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu trong giai đoạn vườn ươm 104

Bảng 3.40. Ảnh hưởng của độ ẩm đến sinh trưởng cây con Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu trong giai đoạn vườn ươm 106

Bảng 3.41. Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống và phát triển cây con Lan Hài vàng trong giai đoạn vườn ươm 107

Bảng 3.42. Ảnh hưởng của phân bón đến tỷ lệ sống và phát triển cây con Lan Hài vàng trong giai đoạn vườn ươm. 108

Bảng 3.43. Ảnh hưởng của cường độ che sáng đến sinh trưởng cây con Lan Hài vàng trong giai đoạn vườn ươm 110

Bảng 3.44. Ảnh hưởng của độ ẩm đến sinh trưởng cây con Lan Hài vàng trong giai đoạn vườn ươm. 113

BẢNG PHỤ LỤC MÔI TRƯỜNG

1. Thành phần môi trường khoáng của Murashige và Skoog (1962)

Khoáng đa lượng	mg/l
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2$ .2H2O	440
$MgSO_4$ .7H_2O	370
KH_2PO_4	170
Khoáng vi lượng	**mg/l**
KI	0,83
H_3BO_3	6,2
$MnSO_4$ .4H_2O	22,3
$ZnSO_4$ .7H_2O	8,6
Na_2MoO_4 .2H_2O	0,25
$CuSO_4$.5H_2O	0,025
$CoCl_2$.6H_2O	0,025
Na_2EDTA · 2H2O	37,3
$FeSO_4$ .7H2O)	27,8
Vitamin và các chất hữu cơ khác	**mg/l**
myo-Inositol	100
Nicotinic acid	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
Thiamine HCl	0,1
Glycine	2,0

2. Thành phần môi trường khoáng của Vacin & Went.

Khoáng đa lượng	mg/l
$(NH_4)2SO_3$	500
KNO_3	525
$Ca_3(PO_4)_2$	200
$MgSO_4$.7H_2O	250
KH_2PO_4	250

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

2.4D:	2.4-Dichlorophenoxyacetic acid.
BA:	Benzylaminopurine.
Cs.:	Cộng sự
CV:	Sai số thí nghiệm.
ĐC:	Đối chứng.
ĐHST:	Điều hòa sinh trưởng.
DNA:	Deoxyribonucleic acid.
EDTA:	Axit etylenediaminetetraacetic.
IAA:	Indole-3-acetic acid.
IBA:	Indole-3-butyric acid.
LSD 5%:	Giá trị sai khác nhỏ nhất có ý nghĩa ở mức xác suất nhỏ 5%.
MS:	Murashige and Skoog.
NAA:	1-Naphthalenaecetic acid.
ND:	Nước dừa.
NPK:	Nitơ - Photpho - Kali.
PLB:	Protocorms - like - body.
TDZ:	Thidiazuron.

MỞ ĐẦU

Hoa lan có hơn 25.000 loài khác nhau, cùng với những loài mới được khám phá và mô tả theo hàng năm. Hoa lan được coi là loài hoa tinh khiết, hoa vương giả cao sang, vua của các loài hoa. Hoa lan không những đẹp về màu sắc mà còn đẹp cả về hình dáng, cái đẹp của hoa lan được thể hiện từ những đường nét của cánh hoa tao nhã đến hình dạng thân, lá ít có loài hoa nào sánh nổi. Nhiều loài lan rừng cho hoa lâu tàn, màu sắc và hương thơm rất đa dạng nên được nhiều người ưa chuộng như các loài thuộc các chi: *Aerides, Coelogyne, Cymbidium, Dendrobium, Paphiopedilum*… và một số loài thuộc chi *Anoectochilus, Dendrobium* được dùng làm dược liệu. Bên cạnh đó, ngành sản xuất hoa lan đem lại giá trị kinh tế rất cao như ở một số nước: Thái Lan, Singapore, Hawaii… việc trồng hoa lan đem lại giá trị kim ngạch xuất khẩu lên đến hàng chục triệu đôla.

Nước ta nằm trong khu vực Đông Nam Á có khí hậu nhiệt đới gió mùa, là một trong những khu vực có thành phần loài thực vật phong phú nhất. Trong đó họ Lan (Orchidaceae Juss.) ở Việt Nam có 152 chi và hơn 897 loài (Theo giáo sư Averyanov chuyên gia nghiên cứu về lan Việt Nam). Trong số đó riêng ở các tỉnh Tây Nguyên đã chiếm gần một nửa số lượng loài, với nhiều loài cho hoa đẹp, có giá trị kinh tế cao và nhiều loài đặc hữu, quý hiếm của Việt Nam.

Tây Nguyên với diện tích khoảng 5 vạn km^2 nằm trong vùng nhiệt đới gió mùa Đông Nam Á, một trong những trung tâm phong phú loài thực vật trên thế giới. Do điều kiện tự nhiên ở đây hình thành nên thảm thực vật nguyên sinh là các loại rừng rậm ưa mưa nhiệt đới, rừng rậm thường xanh và rừng nửa rụng lá mưa mùa nhiệt đới với thành phần loài rất phong phú. Hơn nữa, do địa hình bị chia cắt tương đối mạnh tạo điều kiện thuận lợi cho sự bảo tồn các loài thực vật cổ cũng như hình thành nhiều loài mới, làm cho thực vật khu vực này có tính đặc hữu cao.

Được xem là "trung tâm đa dạng Lan của Việt Nam", Tây Nguyên là nơi phân bố của nhiều loài có ý nghĩa lớn về mặt bảo tồn, trong đó đặc biệt chú ý đến các loài lan đặc hữu (*Dendrobium trankimianum, Phaius baolocensis),* quý hiếm (*Dendrobium nobile, Paphiopedilum villosum)* và có giá trị kinh tế *(Phaius tankervilleae*), đây là những loài đang bị khai thác một cách quá mức dẫn đến khu phân bố của chúng đang dần bị thu hẹp và có nguy cơ không còn tìm thấy trong tự nhiên.

Việc nghiên cứu nhân giống những loài lan đặc hữu, quý hiếm và có giá trị kinh tế này không những đem lại tiềm năng kinh tế to lớn của họ Lan mà còn góp phần bảo vệ nguồn gen thiên nhiên quý hiếm và tạo nguồn nguyên liệu ban đầu để lai tạo ra các con lai mới có giá trị kinh tế. Đặc biệt là trong tình trạng nguồn tài nguyên này đang bị khai thác cạn kiệt và môi trường sống tự nhiên của họ Lan ngày càng bị thu hẹp.

Sau khi đã hoàn thiện được các bước từ nhân giống đến chăm sóc cây trưởng thành ở điều kiện bán hoang dã, tán rừng tự nhiên thì việc làm tiếp theo là sẽ xây

dựng các mô hình trồng lan bán hoang dã, việc làm này vừa nhằm mục đích bảo tồn nguồn gen các loài lan một cách có hiệu quả, vừa nhằm phục vụ loại hình du lịch sinh thái.

Kết quả nhân giống, trồng thử nghiệm thành công các loài Lan có giá trị kinh tế cao ở các mô hình khác nhau đã mở ra một hướng mới bảo tồn và phát triển các giá trị tài nguyên sinh vật đặc hữu của Tây Nguyên. Các mô hình được xây dựng hoàn toàn có điều kiện phát triển mở rộng cho nhiều vùng ở Tây Nguyên, chẳng những có thể bù đắp các thiếu hụt do khai thác quá mức nguồn tài nguyên họ Lan mà còn tạo điều kiện cho phát triển thành mặt hàng xuất khẩu có giá trị.

Xuất phát từ thực trạng đó, việc thực hiện đề tài **"Nghiên cứu phát triển, sử dụng và bảo tồn bền vững 05 loài Lan (*Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis và Phaius tankervilleae*) đặc hữu, quý hiếm và có giá trị kinh tế cao, phục vụ phát triển kinh tế - xã hội tại Lâm Đồng - Tây Nguyên"** là việc làm quan trọng nhằm giúp bảo tồn nguồn gen của các loài lan này, đồng thời có thể góp phần phục vụ phát triển kinh tế - xã hội tại Lâm Đồng - Tây Nguyên.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Đặc điểm hình thái của họ Lan

Họ Lan có khoảng 750 chi và 20.000 - 25.000 loài, phân bố rộng khắp thế giới và đứng vị trí thứ 2 về số lượng loài sau họ Cúc trong ngành thực vật hạt kín. Đây là họ lớn nhất trong lớp một lá mầm. Vì vậy, hình thái và cấu tạo cũng như hệ thống phân loại của họ này hết sức phức tạp.

Nhìn chung, họ Lan bao gồm các loài cây thân thảo, sống lâu năm. Chúng sống ở đất, sống phụ sinh trên cây hay trên đá hoặc một số ít sống hoại sinh. Khi sống ở đất, chúng thường có dạng củ nạc, rễ mập. Tuy nhiên đa số các loài trong họ này thường sống phụ sinh, bám, treo lơ lửng trên các cây gỗ khác. Chúng có hệ rễ khí sinh rất phát triển. Sự phát triển của hệ rễ này phụ thuộc vào hình dạng chung của loài, hệ rễ này vừa làm nhiệm vụ bám chặt lấy giá thể vừa làm nhiệm vụ hút muối khoáng trong không khí, bởi chúng được bao bọc một lớp mô xốp dày, bao gồm những tế bào chết, ngoài ra ở một số rễ non còn đóng vai trò quang hợp cho cây. Thân cây của họ Lan rất ngắn hay kéo dài, đôi khi phân nhánh và mang lá hoặc không mang lá.

Họ Lan có hai kiểu thân, mà đa số đều thuộc loại sinh trưởng hợp trục. Thân này bao gồm một hệ thống nhiều nhánh lâu năm, với bộ phận nằm ngang, bò dài trên giá thể hoặc ẩn sâu trong đất gọi là thân rễ như các chi *Bulbophyllum, Coelogyne*... Ngược lại, một số ít các loài của họ Lan sinh trưởng đơn trục, nghĩa là sự sinh trưởng của trục chính không giới hạn, đối với loại này hệ rễ rất phát triển, to và mập, như các chi *Aerides, Vanda, Vanilla*… Đôi khi có một số loài thân rất ngắn và bị che khuất bởi lá như chi *Taeniophyllum.* Thân các loài sống phụ sinh thường có nhiều đoạn phình to thành củ giả hay còn gọi là thân hành giả. Đó là bộ phận dự trữ nước và các chất dinh dưỡng để nuôi cây trong hoàn cảnh khô hạn. Hầu hết các loài lan đều là cây tự dưỡng, do đó nó phát triển hệ thống lá hoàn chỉnh. Lá mọc đơn độc hoặc xếp dày đặc ở gốc hay trên thân, trên hành giả. Hình dạng lá thay đổi tùy từng loài, từ loại lá mọng nước, nạc, hình kim, hình trụ dài đến loại lá hình phiến mỏng, gốc lá thu thành một cuống hay thành bẹ ôm lấy thân. Phiến lá dạng bản rộng hay hình trụ. Những lá ở sát gốc thường tiêu giảm chỉ còn những bẹ không phiến hay giảm hẳn thành các vẩy.

Hoa của họ Lan có thể mọc riêng lẻ hay tụ hợp thành cụm hoa, thường là chùm, đôi khi phân nhánh thành chùy, ít hay nhiều hoa. Hoa là bộ phận hấp dẫn nhất, về cấu trúc cơ bản là hoa mẫu 3, là kiểu hoa đặc trưng cho lớp một lá mầm nhưng đã biến đổi rất nhiều để có hoa đối xứng qua một mặt phẳng. Hoa thuộc loại lưỡng tính, rất hiếm gặp hoa đơn tính, bao hoa có 2 vòng, mỗi vòng 3 mảnh: ba cánh đài thường giống nhau hoặc cánh đài lưng hơi khác với cánh đài 2 bên, rời nhau, đôi khi cả 3 cánh đài dính nhau. Ba cánh tràng thì 2 cánh bên giống nhau. Chỉ có cánh tràng giữa biến đổi về màu sắc, kích thước, có chức năng đặc biệt là hấp dẫn côn trùng đến để thụ phấn gọi là môi.

Môi là một bộ phận độc đáo về cấu tạo, màu sắc và rất đa dạng của hoa lan, nó được xếp đối diện với cánh đài lưng, có kích thước thường lớn hơn đài và 2 cánh tràng bên. Cánh môi có thể nguyên hay chia thùy, khía răng, có tua viền, gốc cánh môi thường mang một cửa dài hoặc một u lồi, dính với chân của cột nhị nhụy hay kéo dài ra phía trước của cằm. Trong số 6 nhị của hoa mẫu 3 (đặc trưng cho loại hoa hành tỏi) thì ở họ Lan nhị bị tiêu giảm dần từ 3 nhị, hai vòng ngoài, một vòng trong ở chi *Neuwiedia,* giảm xuống loại 2 nhị vòng trong ở chi *Paphiopedilum,* đến 1 nhị ở vòng ngoài ở đại đa số các chi của họ Lan. Nhị hợp với vòi nhụy thành cột nhị nhụy nằm chính giữa hoa, cột này thường dài, thẳng hay cong về phía trước. Nhị chỉ còn thể hiện phần bao phấn. Bao phấn ở đỉnh cột nhị nhụy, nó đối diện với cánh đài lưng. Bao phấn mang khối phấn.

Khối phấn gồm toàn bộ hạt phấn dính lại với nhau. Số lượng khối phấn thay đổi từ 2, 4, 6 đến 8 khối, có chuối và gót bám ở cuối cùng. Hoa họ Lan thuộc bầu hạ, có 3 ô, đính noãn trung trụ ở các loài nguyên thủy, đính noãn bên ở các loài tiến hóa hơn. Quả họ Lan thuộc loại quả nang, mở ra theo 3 - 6 đường nứt dọc. Khi chín quả mở ra và mảnh vỏ còn dính lại với nhau ở hai đầu quả. Hạt rất nhiều, bé, không có nội nhũ và phát tán nhờ gió (Võ Văn Chi và Dương Đức Tiến, 1978).

1.2. Tổng quan về tình hình nghiên cứu nhân giống chi Hoàng thảo *(Dendrobium)*, Lan hài *(Paphiopedilum)* và Hạc đính *(Phaius)*

1.2.1. Tình hình nghiên cứu nhân giống chi Hoàng thảo

Hoàng thảo là một chi lan lớn, chủ yếu sống phụ sinh trên các cành cây, thân cây hoặc trên các hốc mùn, đá. Chúng thường mọc ở nơi ẩm, độ cao 500 - 1.500 m, cũng có khi gặp chi này mọc ở độ cao 200 m hoặc tới 2.000 m so với mực nước biển. Gần đây nhiều loài lan Hoàng thảo được phát hiện và mô tả mới.

1.2.1.1. Trên thế giới

Hoàng thảo là chi lan có nhiều loài được kinh doanh phổ biến trong thị trường hoa lan trên thế giới. Nhân giống chi Hoàng thảo đầu tiên được thực hiện tại Đại học Hawai thông qua nuôi cấy chồi đỉnh. Từ đó đến nay đã có rất nhiều công trình nhân giống chi Hoàng thảo như:

Kanjilal và cs. (1999) đã nuôi cấy giả hành lan *D. moschatum* trên môi trường có bổ sung BA (0; 0.5; 1.0; 2.0; 3.0 mg/l) kết hợp NAA (0; 0.5; 1.0; 2.0; 3.0 mg/l). Kết quả thu được môi trường thích hợp cho sự hình thành protocorms là môi trường bổ sung 3.0 mg/l BA và 2.0 mg/l NAA với 8.4 protocorms/mẫu.

Parasad và cs. (2001) khi nuôi cấy chồi đỉnh lan *D. sonia* trên môi trường MS có bổ sung 1.0 mg/l NAA và 1 mg/l BA. Kết quả sau 25 ngày nuôi cấy đã hình thành cụm chồi với 11 chồi/mẫu.

Nihar và cs. (2002) nghiên cứu tạo protocorms từ lát cắt chồi lan *D. nobile* trên môi trường MS bổ sung một trong ba chất điều tiết sinh trưởng ZR, BA và Kn. Kết quả 80% mẫu cấy hình thành protocorms. Malabaddi và cs. (2004) cũng đã thu nhận được kết quả tương tự khi nuôi cấy lát cắt của chồi *D. nobile* trên môi

trường theo Mitra và cs. (1976) có bổ sung Triacontanol (TRIA) ở nồng độ từ 2.0 – 4.0 mg/l.

Shu và cs. (2004) thành công trong việc nuôi cấy *in vitro* cây *D. tosaense*, các thể PLB đã được nuôi cấy và phát triển thành cây hoàn chỉnh trên môi trường MS cùng với các chất hữu cơ (dịch nghiền chuối và khoai tây).

Ricardo và cs. (2004) nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng đường trong môi trường nuôi cấy *in vitro* lan *D. nobile*. Nồng độ saccarose 60 g/l cho kết quả tốt nhất với chiều cao chồi đạt 4.21 ± 0.6 cm và hệ số nhân đạt 4 lần sau 120 ngày nuôi cấy.

Khi gieo hạt một số loài *Dendrobium* sp., Luan và cs. (2006) đã bổ sung 0.5 mg/l NAA kích thích sự nảy mầm và phát sinh protocorms trên nền môi trường MS.

Niramol (2009) đã nghiên cứu nhân giống loài *D. draconis* Rchb.f. trên môi trường MS bổ sung đường và chất kích thích BA, Kinetin (Kin), NAA ở các nồng độ khác nhau. Kết quả cho thấy môi trường thích hợp để hình thành PLB là môi trường MS bổ sung 2.0 mg/l BA và 1.0 mg/l NAA.

Sana và cs. (2011) nghiên cứu ảnh hưởng của BA, Kin, IBA, NAA và nước dừa đến sự sinh trưởng *in vitro* của chồi *D. nobile*. Kết quả cho thấy môi trường MS bổ sung 2.0 mg/l BA là tốt nhất đến nhân nhanh chồi và môi trường tối ưu cho sự ra rễ của chồi là môi trường MS bổ sung 2.0 mg/l IBA.

Dake và cs. (2013) nghiên cứu nhân giống loài *D. wangliangii* và xác định được môi trường thuận lợi cho sự ra rễ là môi trường ½MS có bổ sung 0.5 mg/l NAA.

Paromik và cs. (2014) khi nghiên cứu nhân giống *D. nobile* trên môi trường MS bổ sung 2.0 mg/l TDZ cho số PLB/mẫu cao nhất. Tuy nhiên, số chồi, chiều dài chồi và chiều dài rễ tốt nhất ở môi trường MS bổ sung 1.5 mg/l TDZ.

1.2.1.2. Ở Việt Nam

Theo Trần Văn Minh và Nguyễn Văn Uyển (2001) thì môi trường MS bổ sung 1.0 mg/l BA và 0.1 mg/l IBA thích hợp cho nhân protocorms của chi này. Hàm lượng nước dừa 15% là chất hữu cơ bổ sung hữu hiệu nâng cao hiệu quả phát sinh chồi trong quá trình nhân giống hoa lan *Dendrobium*. Môi trường MS bổ sung 0.1 mg/l BA và 20% nước dừa là môi trường đạt hiệu quả cao trong tái sinh chồi và chiều cao của chồi lan *Dendrobium in vitro*.

Bùi Thị Tường Thu và Trần Văn Minh (2007) sử dụng môi trường VW bổ sung BA, NAA, Kin, TDZ, nước dừa, đường sucrose nuôi cấy phát sinh và tăng sinh tế bào soma, phát sinh và tái sinh phôi giả (PLB) của cây hoa lan *Dendrobium*.

Nông Văn Duy và cs. (2008) đã nghiên cứu nhân giống *D. thyrsiflorum* kết quả thu được sự hình thành PLB và chồi tốt nhất ở môi trường VW có bổ sung

4.0 mg/l BA và 0.5 mg/l NAA. Kin có tác dụng tốt hơn TDZ trong khả năng kích thích tạo chồi. Nồng độ Kin thích hợp cho việc nhân chồi là 1.5 mg/l. Môi trường ra rễ tốt nhất là môi trường nuôi cấy có bổ sung 2.0 mg/l NAA.

Nguyễn Thị Sơn và cs. (2012) đã nhân giống *in vitro* loài *D. fimbriatum* Hook với nguyên liệu sử dụng là quả lan 5 tháng tuổi. Kết quả môi trường nhân nhanh protocorms tối ưu là môi trường KC bổ sung 10 g sucrose và 60 g khoai tây/l môi trường; môi trường MS bổ sung 20 g sucrose và 60 g chuối chín/l môi trường là thích hợp nhất cho nhân nhanh chồi *in vitro,* môi trường tạo cây hoàn chỉnh là RE bổ sung 1.0 g than hoạt tính/l môi trường.

Vũ Ngọc Lan và cs. (2013) nghiên cứu nhân giống *in vitro D. nobile* cho thấy quả lan 5 tháng tuổi thích hợp để gieo. Môi trường nhân nhanh protocorms tối ưu là KC bổ sung 100 ml nước dừa/l, 10 g saccharose/l và 6.0 g agar/l; nhân nhanh cụm chồi tốt nhất là MS bổ sung 100 ml nước dừa/l, 10 g saccharose/l và 6.0 g agar/l, môi trường tạo cây hoàn chỉnh là RE bổ sung 10 g saccharose/l và 0.5 than hoạt tính/l.

Nguyễn Văn Song và cs. (2013) nhân giống lan *D. chrysotoxum* với nguyên liệu là quả lan 3 tháng tuổi. Môi trường thích hợp cho hình thành và nhân nhanh protocorms là môi trường MS bổ sung 20 g/l sucrose và 2.0 mg/l BAP. Môi trường MS bổ sung 30 g/l sucrose, 1.0 g/l THT, 2.0 mg/l BAP và 1.0 mg/l NAA thích hợp nhất cho tái sinh chồi từ protocorms và sinh trưởng của chồi *in vitro.* Môi trường MS bổ sung 20 g/l sucrose và 1.0 mg/l NAA là thích hợp cho tạo rễ của chồi *in vitro.*

Nguyễn Thị Sơn và cs. (2014) nghiên cứu nhân giống *in vitro* lan *D. officinale* Kimura et Migo cho kết quả: nhân giống bằng gieo hạt trên môi trường VW, nhân nhanh cụm chồi tốt nhất trên môi trường MS bổ sung 60 g chuối chín/l. Nhân giống vô tính thông qua nuôi cấy đoạn thân mang mắt ngủ trên môi trường MS + 0.5 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA. Môi trường tạo cây hoàn chỉnh là RE + 0.5 mg/l NAA và 0.3 g THT.

Đặng Thị Thắm và cs. (2018) đã nhân giống loài *D. heterocarpum*. Kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường thích hợp cho sự hình thành PLB là MS bổ sung 2.0 mg/l BA và 1.0 mg/l NAA hoặc môi trường MS bổ sung 1.0 mg/l TDZ với 0.5 mg/l NAA. Trên môi trường nuôi cấy MS bổ sung 1.5 mg/l BA và môi trường nuôi cấy MS bổ sung 60 g chuối chín/l đều phù hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của chồi cây. Môi trường thích hợp cho sự tạo rễ *in vitro* là ½MS bổ sung 0.5 mg/l NAA.

1.2.2. Tình hình nghiên cứu nhân giống chi Lan Hài

Chi Lan Hài có nguồn gốc từ lục địa Đông Nam Á. Các loài nguyên thuỷ nhất của chi được tìm thấy chủ yếu ở Trung Quốc và Bắc Việt Nam, các loài thuộc chi này có khu phân bố rất hạn chế (Averyanov và cs., 2004). Chi này có khoảng

75 loài phân bố ở vùng nhiệt đới châu Á từ Nam Ấn Độ và Đông Hymalaya đến Philippine, New Guinea và Quần đảo Solomon.

1.2.2.1. Trên thế giới

Công trình nghiên cứu đầu tiên về nuôi cấy Lan Hài được thực hiện bởi Bubeck (1973). Tác giả sử dụng mẫu cấy là các chồi non từ cây bố mẹ sinh trưởng và phát triển tốt, được cấy trên môi trường MS, sau đó được chuyển sang môi trường cảm ứng tạo chồi và rễ. Kết quả thí nghiệm cho thấy cây con được hình thành hoàn chỉnh giống như cây con nảy mầm từ hạt.

Morel (1974) đã tạo được mô sẹo từ mẫu cấy trên môi trường có bổ sung 2,4-D. Sau đó, PLB được hình thành từ những mô sẹo này và cuối cùng cây con được tạo thành trên môi trường không bổ sung 2,4-D.

Stewart và cs. (1975) sử dụng mẫu là đỉnh thân. Mẫu được cấy trên môi trường có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng, điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ngày, sau đó chuyển vào tối khi bắt đầu tăng sinh. Sau 3 tháng mô sẹo được hình thành, tiếp tục tăng sinh nếu còn 2,4-D trong môi trường nuôi cấy. Sau giai đoạn tăng sinh, mẫu cấy được nuôi ngoài sáng với thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày. Các mô sẹo được cấy chuyền sang môi trường có chứa cytokinin để kích thích hình thành PLB.

Huang (1988) đã sử dụng mẫu cấy là chồi non mới nhú của cây trưởng thành, kích thước khoảng 2 - 3 mm và sử dụng môi trường MS cải tiến có bổ sung chất kháng sinh để hạn chế sự phát triển của vi khuẩn và nấm. Mẫu cấy được chuyển sang môi trường khác sau 8 tuần nhằm kích thích sự phát triển của chồi nách. Chồi tạo thành được chuyển sang môi trường tạo rễ, sau 1 tháng cây con được chuyển ra chậu.

Lin và cs. (2000) khi nghiên cứu nhân giống *Paphiopedilum hybrid* tạo mô sẹo trên môi trường MS bổ sung 1.0 - 10 mg/l 2,4-D và 0.1 - 1.0 mg/l TDZ. Mô sẹo tăng trưởng tốt trên môi trường ½MS bổ sung 5.0 mg/l 2,4-D và 1.0 mg/l TDZ.

Li-Chun và cs. (2001) cho rằng TDZ ức chế sự tăng sinh của chồi và sự tạo rễ ở *Paphiopedilum*.

Nhut và cs. (2005) gieo cấy *in vitro* cây Lan Hài và sử dụng nó để tạo chồi bằng cách gây vết thương kết hợp với nuôi cấy trên môi trường lỏng có bổ sung TDZ và NAA, hệ số nhân chồi đã được nâng lên một cách đáng kể.

Patcharawadee và cs. (2011) đã nghiên cứu ảnh hưởng của Cytokinins (BAP và TDZ) và Auxin (2,4-D) đến sự phát triển của *P. callosum.* Sau ba tháng sự tăng trưởng của chồi cao nhất đạt được là 1.6 ± 0.4 chồi/mẫu cấy trong môi trường 0.5 µM TDZ, sau khi đưa vào môi trường ½MS để tạo rễ thì rễ đạt cao nhất là 3.7 ± 0.62/chồi và chiều dài đạt 34.01 ± 4.87 mm.

Songjun và cs (2013) khi nghiên cứu nhân giống loài *Paphiopedilum hangianum* Perner & Gruss đã xác định môi trường tối ưu cho hạt nảy mầm, hình thành protorcom, nhân chồi và ra rễ, môi trường thuận lợi cho sự ra rễ của loài này là môi trường ½MS có bổ sung 1.0 mg/l NAA và 100 g/l BH.

1.2.2.2. Ở Việt Nam

Hoàng Thị Giang và cs. (2010) đã nghiên cứu nhân giống *P. hangianum* Perner & Gurss (Hài hằng) để góp phần vào việc bảo tồn các loài lan rừng quý hiếm. Kết quả cho thấy môi trường RE là thích hợp cho sự nảy mầm, nhân nhanh protocorms, tạo chồi và môi trường thích hợp tạo rễ cũng là môi trường RE nhưng có bổ sung 0.4 - 0.6 mg/l α-NAA.

Nguyễn Thị Cúc và cs. (2014) khi nghiên cứu ảnh hưởng của một số hợp chất hữu cơ lên quá trình sinh trưởng và phát triển cây lan Hài hồng *P. delenatii in vitro*. Kết quả cho thấy, cả ba nhóm hợp chất hữu cơ đều có tác dụng làm gia tăng số lượng chồi, đặc biệt tảo spirulina không những kích thích quá trình tạo chồi mà còn làm gia tăng tỷ lệ sống của mẫu cấy lan hài hồng *in vitro*. Trong nhóm chuối, khoai tây và nước dừa thì chuối có tác động mạnh nhất lên quá trình tạo chồi và số chồi đạt cao nhất ở nồng độ 20 g/l với 3.8 chồi/mẫu cấy. Đối với nhóm peptone, triptone và bột nấm men, bột nấm men có tác động mạnh nhất lên quá trình tạo chồi và số chồi đạt cao nhất ở môi trường bổ sung 1.0 g/l bột nấm men. Tỷ lệ sống của chồi đạt 100% khi bổ sung 50 mg/l bột tảo spirulina với số chồi đạt cao nhất là 4.0 chồi/mẫu cấy.

1.2.3. Tình hình nghiên cứu nhân giống chi Hạc đính

Chi Hạc đính được biết đến đầu tiên bởi Loureiro (1970) với loài *Phaius grandiflorus* Lour. như 1 loại chung cho chi này. Theo thống kê hiện nay chi này có khoảng 50 loài (Trần Hợp, 2000), phân bố rộng rãi từ Châu Phi nhiệt đới qua lục địa Ấn Độ, Bhutan, Trung Quốc, khắp Đông Nam Á đến Guinea, Úc và một số đảo Thái Bình Dương (Van Duy Nong và cs., 2012). Giống lan này thường được gọi là Nu's Orchid hay Veiled orchid, lan này mọc dưới đất.

Hạc đính thuộc nhóm đa thân với các giả hành hình tháp, lá to và rộng (15 x 60 cm), hoa to, đường kính có thể lên tới 12 cm với nhiều sắc hoa khác nhau. Hoa có hương thơm rất đặc trưng và lưỡi hình ống như Cattleya, đài và cánh có màu sắc giống nhau, mặt sau của hoa có màu trắng sữa, mặt trước tùy theo thứ loài.

Do quá trình lai tạo tự nhiên, hoa có nhiều màu biến đổi từ nâu đỏ, socola cho đến vàng xanh. Hạc đính là một trong những cây lan nhiệt đới đầu tiên nở hoa ở Châu Âu. Đây là loài lan chịu ẩm, điều kiện sinh thái tự nhiên là các vùng đầm lầy, chính vì thế nếu bị úng nước ở phần giá thể cây có thể bị chết.

Hạc đính có thể trồng ở vùng á nhiệt đới và vùng nóng, nhiệt độ thích hợp là từ 10^{o}C - 25^{o}C. Tuy nhiên ở vùng nguyên quán Nam Trung Bộ, Hạc đính trổ hoa vào tháng 1 - 2 nhưng nếu được trồng ở thành phố Hồ Chí Minh, cây lan sẽ ra hoa vào tháng 3. Ánh sáng cần thiết từ 8.000 - 15.000 lux/m^2.

Puangpaka và cs. (2001) đã nghiên cứu ảnh hưởng của cường độ ánh sáng lên sự phát triển của loài *Phaius tankervilliae* trong điều kiện nhân giống *in vitro*. *P. tankervilliae* được nuôi cấy trên các môi trường với cường độ ánh sáng khác nhau là 28, 37, 56, 74 và 93 mmol m^{-2} s^{-1}. Loài *P. tankervilliae* được nuôi cấy trên môi trường VW, bổ sung 100 g/l chuối không có saccharose. Thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện nhiệt độ 25° ± 2°C, với thời gian quang hợp 16 giờ. Kết quả cho thấy điều kiện thích hợp cho sinh trưởng và phát triển của loài này ở cường độ ánh sáng là 74 μmol m^{-2} s^{-1}.

Bijaya và cs. (2011) đã tiến hành gieo hạt *in vitro* loài *P. tankervilleae*. Môi trường MS bổ sung 0.5 mg/l BAP là môi trường tối ưu cho sự nảy mầm của hạt, sự hình thành protocorms và sự phát triển của cây con. Sự nảy mầm bắt đầu sau 7 tuần nuôi cấy và cây con hoàn thiện sau 24 tuần nuôi cấy. Điều này cho thấy phương pháp gieo hạt rất hữu ích cho việc nhân giống lan.

Bijaya và Sumitra (2011) cũng đã nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài *P. tankervilleae* bằng phương pháp gieo hạt. Môi trường thích hợp nhân nhanh chồi là môi trường MS bổ sung 1.0 mg/l BAP với số lượng chồi trung bình 13.3 chồi/mẫu trong 20 tuần. Nồng độ NAA 0.5 mg/l thích hợp cho sự phát triển rễ.

Duangnapa và cs. (2012) cũng tiến hành các thí nghiệm nhân giống *in vitro* loài *P. tankervilleae*. Trong thí nghiệm đầu tiên, sau 16 tuần nuôi cấy, số PLB lớn nhất là 3.25 với tỷ lệ phần trăm tạo PLB đạt 75% và chiều rộng PLB là 1.29 cm trong môi trường VW. Ở thí nghiệm thứ hai, sau 12 tuần nuôi cấy, số PLB lớn nhất (6.75), tỷ lệ phần trăm tạo PLB đạt 91.67%, chiều rộng PLB là 1.12 cm và trọng lượng tươi 0.45 g trong môi trường VW bổ sung 0.004 mg/l Triacontanol và 0.1 mg/l BA. Trong thí nghiệm thứ ba, sau 8 tuần nuôi cấy, số lượng chồi lớn nhất là 7.38, số lượng rễ tối đa là 4.38 rễ/chồi thu được từ môi trường VW bổ sung 0.4 mg/l triacontanol và 0.1 mg/l BA.

Sultana (2012) sử dụng chồi nách một năm tuổi của loài *P. tankervilliae* làm vật liệu nhân giống. Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ 1.5 mg/l BAP thích hợp để nhân nhanh cho số lượng chồi nhiều nhất. Chiều cao chồi cao nhất ở nồng độ 0.5 mg/l BAP. Nồng độ tối ưu để kéo dài đốt thân là 0.5 μM GA_3. Nồng độ thích hợp để kích thích sự phát triển của rễ là 0.1 mg/l NAA.

Từ tổng quan về tình hình nhân giống các loài thuộc chi Hoàng thảo, Lan Hài và Hạc đính trên thế giới và ở Việt Nam, chúng tôi nhận thấy công tác nhân giống, gây trồng và bảo tồn các loài lan rừng ở Việt Nam nói chung và Tây Nguyên nói riêng chủ yếu thu ngoài thiên nhiên là chính. Cũng có một số phòng nuôi cấy mô nhân giống về lan, nhưng chủ yếu tập trung vào các giống lan lai nhập nội từ Thái Lan, Đài Loan… Còn việc nhân giống, gây trồng bảo tồn, phát triển khai thác bền vững các loài lan rừng đặc hữu, quý hiếm và có giá trị kinh tế ít được chú ý đến.

1.3. Đặc điểm tự nhiên khu vực nghiên cứu - Cao nguyên Đà Lạt

1.3.1. Vị trí địa lý và địa hình

Cao nguyên Đà Lạt (cao nguyên Lâm Viên, cao nguyên Lang Biang, bình sơn Đà Lạt) là một cao nguyên thuộc Tây Nguyên, Việt Nam với độ cao trung bình khoảng 1.500^{o} m so với mực nước biển. Phía nam cao nguyên có thành phố Đà Lạt. Phía đông và đông nam dốc xuống thung lũng sông Đa Nhim, tây nam hạ đột ngột xuống cao nguyên Di Linh. Diện tích khoảng 1.080 km^2. Địa hình đồi núi trập trùng độ dốc dao động 8 - 10^{o}. Tại đây có các đỉnh núi cao như Bidoup (2.287 m), Lang Biang (2.167 m), Hòn Giao (2.010 m) thuộc Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà. Nước sông trên cao nguyên chảy chậm, những chỗ bị chặn lại tỏa rộng thành hồ như hồ Xuân Hương, hồ Tuyền Lâm nằm trong khu du lịch Hồ Tuyền Lâm, hồ Than Thở, hồ Đa Thiện, hồ Đan Kia (Suối Vàng). Rìa cao nguyên có các thác lớn như thác Cam Ly, Prenn, Gù Gà, Ankrôet, thác Voi. Phong cảnh đẹp, khí hậu trong lành có rừng thông ba lá diện tích lớn, kiểu rừng này vẫn còn trong nội ô thành phố Đà Lạt như khu vực thuộc Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, phường 7, thành phố Đà Lạt. Cao nguyên Đà Lạt chỉ chiếm khoảng 30% diện tích của toàn tỉnh Lâm Đồng, nằm trên các huyện Lạc Dương, Đam Rông và thành phố Đà Lạt.

Địa điểm được chọn khảo sát cho nghiên cứu trồng thử nghiệm lan gồm: Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, phường 7, thành phố Đà Lạt, khu du lịch Hồ Tuyền Lâm và Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà. Cả 3 khu vực này đều mang các đặc điểm tương đồng về nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng. Riêng về kiểu thảm thực vật ở mỗi khu vực có sự khác biệt sẽ được khảo sát đánh giá cụ thể.

1.3.2. Nhiệt độ

Theo số liệu quan trắc của trạm khí tượng thủy văn thành phố Đà Lạt, nhiệt độ trung bình hàng năm là 18.3^{o}C, nhiệt độ trung bình cao nhất vào tháng 5 và tháng 6 là 19.5^{o}C, nhiệt độ trung bình thấp nhất vào tháng 12 năm trước và tháng 1 năm sau là 16.4^{o}C. Nền nhiệt này rất thích hợp với sức khỏe của con người, đặc biệt đối với các loại hình du lịch nghỉ dưỡng và chữa bệnh, biên độ chênh lệch giữa ngày và đêm khá lớn, cao nhất vào mùa khô khoảng 12 - 13^{o}C/ngày.

Mặc dù nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới gió mùa nhưng ở Đà Lạt hầu như không có ngày nào nền nhiệt độ trung bình ngày lớn hơn hoặc bằng 25^{o}C hay thấp hơn 10^{o}C.

Với điều kiện nhiệt độ ưu đãi là môi trường lý tưởng cho các loài Lan phát triển, vì thế việc nhân giống thử nghiệm 05 loài Lan *Dendrodium nobile, Dendrodium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis* và *Phaius tankevrilleae* đặc hữu, quý hiếm và có giá trị kinh tế cao sẽ có nhiều thuận lợi, khả năng áp dụng vào sản xuất là khả thi.

1.3.3. Độ ẩm

Độ ẩm không khí tương đối trung bình trên 85%. Độ ẩm không khí trung bình có sự chênh lệch rõ rệt giữa các tháng mùa mưa (tháng 4 - 11) và mùa khô (tháng 12 năm trước đến tháng 3 năm sau).

Mùa mưa ở Đà Lạt thường bắt đầu từ cuối tháng 4, đầu tháng 5 và kết thúc vào cuối tháng 10 sang đầu tháng 11. Tuy nhiên, hằng năm mùa mưa có thể xê dịch, thời gian bắt đầu và kết thúc khác nhau, sớm hay muộn, nhưng nhìn chung ở Đà Lạt mùa mưa kéo dài khoảng hơn 6 tháng.

Lượng mưa trong năm tập trung chủ yếu vào các tháng 7, 9 và 10 là 3 tháng có sự hoạt động mạnh của trường gió mùa Tây Nam. Năm có tổng lượng mưa cả năm lớn nhất là năm 1973 (2.191 mm) và năm có tổng lượng mưa năm nhỏ nhất là năm 1965 (1.076 mm). Trong mùa mưa, tháng có tổng lượng mưa lớn nhất là tháng 9 năm 1973 (493 mm) và tháng có tổng lượng mưa nhỏ nhất là tháng 5 năm 1988 (41 mm).

1.3.4. Ánh sáng

Đà Lạt là nơi có tổng số giờ nắng trong năm tương đối cao, tổng số giờ nắng trong năm ở Đà Lạt dao động trong khoảng từ 2.507 đến 1.883 giờ. Trung bình trong một năm có khoảng 2.258 giờ có nắng, tổng số giờ nắng trong năm tập trung chủ yếu vào các tháng 12, 1, 2, 3 trong mùa khô.

Độ dài thời gian chiếu sáng trong ngày trong các mùa không chênh lệch nhiều: trung bình mỗi ngày có khoảng từ 11 đến ít hơn 12 giờ (trong mùa đông) và trên 12 giờ (trong mùa hè).

Lượng bức xạ tổng cộng lý tưởng trung bình năm ở Đà Lạt là 140 kCalo/cm^2/năm. Sự phân bố bức xạ tổng cộng lý tưởng giữa các tháng trong năm khác nhau: tháng nhiều nhất là tháng 4 (trên 16 kCalo/cm^2), tháng ít nhất là tháng 8 (chỉ đạt 9.3 kCalo/cm^2).

Vào mùa mưa lượng bức xạ thu nhập giảm dần. Tháng 9 mưa nhiều, lượng mây tổng quan trung bình đạt trên 8/10 bầu trời, đây là tháng bức xạ thu nhập đạt giá trị thấp nhất trong năm.

1.3.5. Chế độ gió

Mặc dù điều kiện địa hình tác động không ít đến hướng gió, song gió ở Đà Lạt vẫn giữ được hai hướng chính và tiêu biểu là hướng Đông Bắc và hướng Tây.

Từ tháng 10 gió Đông Bắc đã ảnh hưởng đến thời tiết Đà Lạt. Trường gió này hoạt động mạnh vào các tháng 11, 12 và tháng 1 năm sau với tần suất 45 - 65%. Sang tháng 2 tần suất gió Đông Bắc giảm chỉ còn đạt khoảng 26% và tháng 3, tháng 4 gió Đông lại chiếm ưu thế hơn so với gió Đông Bắc song tần suất cũng ít khi vượt quá 20%.

Từ tháng 5 đến tháng 9 là thời kỳ hoạt động của trường gió Tây, xen kẽ với gió Tây Nam và Tây Bắc với tần suất khoảng 10 - 15%. Gió Tây hoạt động mạnh nhất vào tháng 8 với tần suất khoảng trên 60%.

Do ảnh hưởng của độ cao địa hình nên tốc độ gió ở Đà Lạt tương đối lớn, tốc độ gió trung bình năm đạt khoảng 2.2 m/s.

1.3.6. Thảm thực vật

Do điều kiện tự nhiên, đặc biệt là địa hình và khí hậu, tạo nên khu vực Tây Nguyên thảm thực vật rất đa dạng với các kiểu rừng khác nhau, phong phú về số loài. Sự thay đổi thành phần thảm thực vật chủ yếu theo độ cao. Ở độ cao trên 1.000 m xuất hiện cây lá kim, nhưng càng xuống thấp có nhiều loài cây lá rộng, cây bụi, dây leo và các loại thực vật phụ sinh khác. Những loài có giới hạn sinh thái rộng hầu như phổ biến ở nhiều vùng, ngược lại những loài có giới hạn sinh thái hẹp chỉ có ở những vùng tiểu khí hậu nhất định.

Chính sự chia cắt các dãy núi cao, đã bảo tồn ở đây nhiều loài thực vật cổ xưa và quý hiếm như Bách xanh *(Calocedrus macrolepis),* Thông 2 lá dẹt *(Pinus krempfii* Lecomte), Thông đỏ (*Taxus wallichiana* Zucc.), Thông nước [*Glyptostobus pensilis* (Staunt.) K. Koch]...

Mặt khác giữa các cao nguyên không có sự phân cắt lớn, không tạo nên chướng ngại về mặt địa hình cản trở sự lan truyền thực vật. Thảm thực vật ở đây tồn tại các loài cây lá rộng phổ biến: họ Dẻ (Fagaceae), họ Côm (Elaeocarpaceae), họ Dầu (Dipterocarpaceae), họ Đỗ quyên (Ericaceae), họ Thầu dầu (Euphorbiaceae), họ Óc chó (Juglandaceae), họ Hoa hồng (Rosaceae). họ Cam (Rutaceae), họ Bồ hòn (Sapindaceae), họ Chè (Theaceae)...

Theo Phan Kế Lộc (1985) thì vùng Tây Nguyên có 5 kiểu rừng chính sau:

Rừng nhiệt đới ưa mưa (hay rừng mưa nhiệt đới)

Kiểu rừng này chủ yếu là các cây gỗ thường xanh lá rộng, không chịu lạnh và khô. Cây không có vẩy chồi. Có thể tồn tại ở một vài điểm tại các thung lũng nhỏ không có mùa lạnh và mùa khô rõ rệt và không chịu ảnh hưởng gió mùa Đông Bắc.

Kiểu rừng này có các loài cây bì sinh trong đó có họ Lan phát triển tốt.

Rừng rậm nhiệt đới thường xanh mưa mùa

Kiểu rừng này có đặc điểm sinh học nổi bật là chồi cây gỗ phần lớn được bao bởi vẩy chồi. Khí hậu có hai mùa rõ rệt là mùa khô và mùa mưa luân phiên nhau, chiếm một diện tích lớn ở Tây Nguyên trên các loại đất khác nhau. Nhưng do sự khai thác của con người vì nhiều mục đích khác nhau nên đại bộ phận diện tích đã bị thay thế bởi các thảm thực vật thứ sinh khác nhau.

Kiểu rừng này tồn tại ở ba độ cao khác nhau từ thấp lên cao và thành phần loài, cấu trúc và đặc tính sinh học của rừng cũng thay đổi rõ rệt.

a. Ở địa hình thấp: (từ 600 m trở xuống) thì rừng rậm nhiệt đới thường xanh mưa mùa nằm trong đai khí hậu với lượng mưa trung bình năm từ 2.000 - 2.500 mm hay hơn và có mùa khô không dài nhưng khắc nghiệt.

Rừng phát triển dưới điều kiện khí hậu nóng ẩm và thổ nhưỡng rất thuận lợi nên rừng có đầy đủ 5 tầng, trong đó có 3 tầng cây gỗ đóng vai trò quan trọng. Trữ lượng gỗ cao nhất, chứa đựng nhiều loại gỗ quý.

Tầng ưu thế sinh thái có tán rừng dày, liên tục. Hiện tượng bì sinh ở đây khá phong phú, có cả bì sinh trên lá. Loại rừng này rất phù hợp cho các loài Lan phụ sinh phát triển.

b. Ở địa hình núi thấp: loại rừng này phát triển ở đai độ cao từ 600 - 1.600 m. Có sự thay đổi dần thành phần cây gỗ theo độ cao, càng lên cao càng nhiều các đại diện các họ Dẻ (Fagaceae), Long não (Lauraceae) và đại diện các họ khác giảm dần như họ Dầu (Dipterocarpaceae), họ Xoan (Meliaceae), họ Đào lộn hột (Anacardiaceae), họ Đậu (Fabaceae)…

Tầng vượt tán biến mất dần, rừng chỉ còn có 2 tầng cây gỗ là tầng ưu thế sinh thái và tầng dưới tán rừng. Trong kiểu rừng này nhiều thực vật bì sinh thuộc Dương xỉ và họ Lan.

c. Ở núi trung bình: Rừng phân bố chủ yếu trên các sườn, đường đỉnh, đỉnh núi từ đai độ cao 1.600 m đến đỉnh núi cao (Chư Yang Sin, Bidoup). Nét đặc trưng ở tầng cây gỗ là thân ngắn, phân cành thấp, tạo nên kiểu rừng thấp. Rừng nhiều sương mù.

Thực vật bì sinh rất phong phú gồm các loài Rêu, Địa y, các loài Dương xỉ… bao kín thành lớp dày xung quanh thân và cành cây gỗ, tạo điều kiện tốt cho sự hiện diện của các loài Lan.

Rừng rậm nhiệt đới nửa rụng lá

Nét đặc trưng của kiểu rừng này là đa số cây gỗ tầng trên (tầng ưu thế sinh thái) rụng lá mùa khô, trong khi đó nhiều cây gỗ của tầng dưới tán rừng là thường xanh. Cây gỗ hầu hết có vẩy chồi. Kiểu rừng này tồn tại ở địa hình thấp, có lượng mưa ít, mùa khô kéo dài.

Kiểu rừng này thực vật bì sinh ít gặp và cũng ít thích hợp cho các loài Lan phát triển.

Rừng tre nứa

Rừng tre nứa tập trung chủ yếu ở Tây Nam Lâm Đồng. Thường phân bố dọc theo khu vực ven suối có độ ẩm cao. Chúng có nguồn gốc thứ sinh và ở khu vực có độ cao dưới 1.000 m.

Kiểu rừng này chỉ có một số ít loài Địa lan ở ven suối.

Rừng lá kim

Tây Nguyên là nơi có rừng thông tự nhiên lớn và tập trung. Ở đây có 2 loại thông là Thông hai lá *(Pinus merkusii)* và Thông ba lá *(Pinus kesiya)* tạo thành 2 loại rừng tự nhiên riêng biệt. Hai loại thông này ở Tây Nguyên có diện tích khoảng 124.000 ha.

Thông ba lá là cây ưa sáng, không chịu nhiệt độ cao, phân bố ở độ cao 900 - 1.800 m so với mặt biển, tập trung ở Đức Trọng, Đơn Dương, Cao nguyên Langbian.

Thông hai lá là cây không chịu được nhiệt độ thấp, phân bố ở độ cao dưới 900 m so với mặt biển, tập trung ở Cao nguyên Di Linh.

Rừng thông có cấu trúc 4 tầng. Tầng ưu thế sinh thái có độ che phủ không quá 50%. Các cây lá kim đều có rễ nấm ngoại sinh để dễ lấy nước và muối khoáng. Do đó đất rừng thông khô, đồng thời lại chua vì lá thông phân hủy ra các acid hữu cơ. Tầng cây bụi và cỏ trong rừng thông thưa. Khí hậu rừng thông khô hơn rừng lá rộng và thoáng gió, không thích hợp với sự phát triển của lan nên ít có lan phụ sinh trong rừng.

1.4. Nhân giống lan

1.4.1. Nhân giống sinh dưỡng

1.4.1.1. Tách bụi

Các cây lan sau khi đã phát triển chật chậu (lan đa thân: *Cattleya, Dendrobium*) phải được tách chiết để trồng lại.

Phương pháp tách bụi thường tiến hành khi cây bò ra khỏi mép chậu, nhưng thường nhất là tiến hành đồng thời vào lúc thay chậu khi giá thể đã hết tác dụng. Tách bụi thường tiến hành sau thời kỳ lan nghỉ và bắt đầu bước vào thời kỳ tăng trưởng (cuối mùa mưa, đầu mùa khô), khi các mắt ngủ bắt đầu phình to ở giả hành và rễ bắt đầu nhú ra.

Các giống địa lan, người chơi lan thường áp dụng phương pháp nhân giống truyền thống này và đã thu được kết quả tốt. Sau đây là kỹ thuật tách nhánh hoa địa lan hoa to:

Khi thay chậu có thể kết hợp tiến hành tách cây, thông thường nhân giống bằng tách cây 3 - 4 năm tiến hành một lần vào mùa hoa đã tàn, bởi vì lúc này cây bắt đầu chuẩn bị cho mùa sinh trưởng và phát triển mới. Nhân giống bằng tách cây cần chọn những cây sinh trưởng khỏe, thường là mỗi khóm 10 mầm trở lên. Những cây được chọn làm cây mẹ để tách cần được chăm sóc dinh dưỡng đầy đủ vài tháng trước khi tách cây để sau khi tách cây sẽ phục hồi nhanh. Trước khi tách 7 - 10 ngày cần khống chế nước giữ cho giá thể hơi khô tiện cho thao tác tách cây, tránh được đứt rễ khi cho cây ra khỏi chậu.

1.4.1.2. Nhân giống lan bằng thân hành giả

Nhân giống bằng thân hành giả tức là sử dụng thân hành giả của năm trước đã nở hoa. Bởi vì mỗi thân hành giả thường có các chồi ngủ, khi nó bị tách khỏi

cơ thể mẹ sẽ có khả năng nảy mầm. Khi thân hành giả bắt đầu nảy mầm, cắt bỏ các rễ khô và sau đó ngâm vào Vitamin B12 khoảng 30 phút rồi dùng bông ướt cuốn lại, sau nửa ngày mới đưa vào chậu để trồng.

Khoảng sau nửa tháng mỗi ngày cho chiếu sáng nửa ngày, tưới nước giữ ẩm cho cây khoảng 2 tháng sau nảy mầm. Lúc này đưa vào vườn ươm có che nắng để tránh ánh sáng trực xạ, chú ý khống chế nước, đến khi mầm dài 2 cm, cho tiếp xúc với ánh sáng tán xạ hoặc cho tiếp xúc với ánh sáng nhẹ trước 8 giờ 30 phút sáng, lúc này độ ẩm giá thể cần điều chỉnh cho phù hợp, nên để hơi khô, thỉnh thoảng phun chất dinh dưỡng theo định kỳ. Chăm sóc cây khoảng 4 - 6 tháng có thể thành cây trồng. Mầm mới đem trồng với đất pha cát trộn với đất bùn hoặc giá thể khác. Sau khi trồng một tuần, mỗi ngày tưới nước 2 lần. Khi nào cây giống đã sống mới chuyển sang chăm sóc bình thường. Thân hành giả bị tách lấy mầm được chăm sóc cẩn thận, sang năm vẫn có thể nảy mầm.

1.4.1.3. Nhân giống bằng tách nhánh

Ở một số loài lan *(Dendrobium, Thunia...)* thường có hiện tượng tạo cây con trên giả hành một cách tự nhiên, khi cây con này có rễ là có thể tách ra khỏi giả hành để trồng.

Đối với một số loài lan đơn thân (*Vanda, Arachnis...)* khi thân cao lớn có thể cắt phần ngọn 30 - 50 cm có ít nhất 2 - 3 tầng rễ để trồng. Phần gốc bên dưới nếu có lá vẫn có thể ra chồi bên, từ đó có thể tách ra trồng như trên.

Đối với lan *Vanlilla* và *Vanda* có thể cắt thân ra từng đoạn 3 - 4 đốt để trồng vì loại này rất dễ hình thành rễ bất định.

1.4.2. Nhân giống trong ống nghiệm (*in vitro*)

Nhân giống *in vitro* hay nuôi cấy mô tế bào thực vật đều là thuật ngữ mô tả các phương thức nuôi cấy các bộ phận của thực vật trong ống nghiệm có chứa môi trường xác định ở điều kiện vô trùng. Môi trường nuôi cấy có các chất dinh dưỡng thích hợp như muối khoáng, vitamin, các hormon sinh trưởng và đường. Kỹ thuật nuôi cấy mô cho phép tái sinh chồi hoặc cơ quan từ các mô như lá, thân, hoa hoặc rễ.

1.4.2.1. Các bước nhân giống in vitro

- *Tạo thể nhân giống in vitro.*

Mẫu được nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng thích hợp để tạo thể nhân giống *in vitro*. Có hai thể nhân giống *in vitro* là thể chồi và thể cắt đốt. Tạo thể nhân giống *in vitro* phụ thuộc vào đặc điểm nhân giống ngoài tự nhiên của cây trồng. Đối với những loài không có khả năng nhân giống, người ta thường nhân giống bằng cách tạo cụm chồi từ callus (mô sẹo). Trong môi trường nhân giống thường bổ sung cytokinin, GA_3 và các chất hữu cơ khác.

- *Nhân giống in vitro.*

Đây là giai đoạn quan trọng trong nhân giống cây trồng bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật nhằm mục đích tăng sinh khối thể nhân giống. Vật liệu nuôi cấy là những thể chồi, môi trường nuôi cấy thường giống môi trường tạo thể chồi, đôi khi nồng độ chất sinh trưởng giảm thấp cho phù hợp với quá trình nhân giống kéo dài. Điều kiện nuôi cấy thích hợp giúp cho quá trình tăng sinh diễn ra nhanh. Cây nhân giống *in vitro* ở trạng thái trẻ hoá và được duy trì trong thời gian dài.

- *Tái sinh cây hoàn chỉnh in vitro.*

Đây là giai đoạn tạo cây con hoàn chỉnh có đầy đủ thân, lá và rễ để chuẩn bị chuyển ra vườn ươm. Cây con phải khỏe mạnh để nâng cao sức sống khi ra môi trường bình thường. Các chất có tác dụng tạo chồi được loại bỏ, thay vào đó là các chất kích thích quá trình tạo rễ. Các chất auxin thường được dùng để kích thích ra rễ.

- *Chuyển cây in vitro ra vườn ươm.*

Đây là giai đoạn mắt xích quan trọng trong quy trình nhân giống vô tính. Cây *in vitro* được nuôi cấy trong điều kiện ổn định dinh dưỡng, ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm nên khi chuyển ra vườn ươm, với điều kiện tự nhiên hoàn toàn khác hẳn như dinh dưỡng thấp, ánh sáng có cường độ mạnh, nhiệt độ cao, ẩm độ thấp, cây con dễ bị stress, dễ mất nước và mau héo. Để tránh tình trạng này, vườn ươm cây cấy mô phải mát, cường độ chiếu sáng thấp, nhiệt độ không khí mát, ẩm độ cao.

Cây con thường được cấy trong luống ươm cây có cơ chất dễ thoát nước, tơi xốp, giữ được ẩm, trong những ngày đầu cần được phủ nylon để giảm sự thoát hơi nước ở lá (thường từ 7 - 10 ngày kể từ ngày cấy). Rễ được tạo ra trong quá trình nuôi cấy mô sẽ dần dần lụi đi và rễ mới xuất hiện, cây con thường được xử lý ra rễ bằng cách ngâm rễ hay phun lên lá để rút ngắn thời gian ra rễ.

1.4.2.2. Môi trường dinh dưỡng trong nhân giống in vitro

Thành phần môi trường nuôi cấy mô thực vật thay đổi tùy theo loài và bộ phận nuôi cấy. Môi trường để nuôi tạo mô sẹo, môi trường nuôi tế bào đơn và môi trường nuôi protoplast có những khác nhau khá cơ bản. Muốn duy trì mô ở trạng thái mô sẹo, muốn tạo rễ, tạo mầm hay tái sinh cây hoàn chỉnh, môi trường nuôi cấy phải thay đổi nhiều hay ít. Tuy vậy, tất cả các môi trường bao giờ cũng gồm có 5 thành phần:

- Đường làm nguồn carbon.
- Các muối khoáng đa lượng.
- Các muối khoáng vi lượng.
- Các vitamin.
- Các chất sinh trưởng.

Ngoài ra, còn thêm một số chất hữu cơ có thành phần hóa học xác định (acid amin, EDTA…) hoặc không xác định (nước dừa, yeast extract…).

1.4.2.3. Các chất điều hoà sinh trưởng

Chất điều hoà sinh trưởng hoạt động với liều lượng rất thấp (10^{-9}), ở liều cao chúng trở nên độc, điều này cho phép một vài chất kích thích tố được sử dụng như các chất diệt cỏ dại.

- Auxin

Auxin là một chất có nhân indole, có công thức nguyên là $C_{10}H_9O_2N$. Auxin gồm có hai loại là auxin có nguồn gốc nội sinh (được tổng hợp bởi thực vật) và auxin tổng hợp do con người tạo ra.

Các loại auxin tổng hợp thông dụng thường dùng: IAA, IBA, NAA, 2.4-D.

Bản chất hóa học của auxin tự nhiên trong các tế bào thực vật là acid βindolacetic (IAA). Auxin kích thích sự phân chia tế bào một cách đặc biệt trong quá trình hình thành mô sẹo và sự hình thành rễ bất định, ức chế sự phát triển của chồi nách và sự hình thành phôi soma trong môi trường nuôi cấy mô sẹo. Auxin tác động lên sự kéo dài tế bào và thay đổi tính thẩm thấu của màng tế bào. Đối với một số loài, auxin cần cho sự hình thành rễ từ các đoạn cắt.

- *Cytokinin*

Phần lớn cytokinin là dẫn xuất của purine. Trong môi trường nuôi cấy, việc thêm cytokinin sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân chia tế bào và hình thành chồi. Cytokinin tự nhiên đầu tiên phát hiện được và cũng là dạng phổ biến nhất là Zeatin tách từ hạt ngô. Có hai loại cytokinin được sử dụng nhiều nhất là Kinetin (Kin) và BAP.

Cytokinin tác động hiệu quả lên sự phân chia tế bào với sự hiện diện của auxin: auxin tạo điều kiện thuận lợi cho sự nhân đôi DNA và cytokinin cho phép tách rời chromosome.

Cytokinin có vai trò trong sự tạo cơ quan thực vật, chúng kích thích mạnh mẽ sự thành lập chồi non, trái lại chúng là chất đối kháng với sự tạo rễ.

Cytokinin kích thích lên sự chuyển hóa, bảo vệ các chất chuyển hóa chống lại tác động của enzyme ly giải làm chậm quá trình lão hoá. Các chồi nách được xử lý bằng cytokinin sẽ tăng trưởng và cạnh tranh với chồi đỉnh.

- *TDZ (N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea)*

TDZ là một hợp chất hóa học tổng hợp có nhóm thế phenylurea có đặc tính sinh học đặc biệt vừa hoạt động giống cytokinin vừa hoạt động giống auxin, được sử dụng như chất điều hòa tăng trưởng thực vật nhân tạo trong nuôi cấy mô. TDZ gây ra những phản ứng khác nhau trong quá trình nuôi cấy mô từ việc cảm ứng tạo mô sẹo đến sự hình thành phôi soma. Về cấu trúc, TDZ hoàn toàn khác với các auxin và cytokinin loại adenin. Trong phân tử TDZ có hai nhóm chức: nhóm

phenyl và nhóm thidiazol, sự thay thế một trong hai nhóm trên bằng những cấu trúc vòng làm giảm hoạt tính của nó (Mok và cs., 1982).

TDZ có tác động mạnh, cảm ứng tái sinh dễ dàng ngay cả ở những cây khó tái sinh (Tre, Táo…). Tùy thuộc vào nồng độ và thời gian xử lý TDZ, mô có những đáp ứng thay đổi sinh hóa, sinh lý, hình thái khác nhau.

TDZ tương đối bền trong hệ thống tái sinh và vẫn có hoạt tính cao ngay cả sau một thời gian dài được dự trữ trong dung dịch mẹ.

1.4.2.4. PLB (Protocorms - like body)

Protocorms là một cơ quan dự trữ nhỏ được hình thành từ phôi đang nảy mầm. Phôi này bao gồm một đỉnh sinh trưởng và một lá mầm.

PLB là một thuật ngữ thích hợp để chỉ những cấu trúc giống với protocorms và có nguồn gốc từ nuôi cấy *in vitro* đỉnh sinh trưởng hay mô phân sinh của chồi bất định. Thuật ngữ này được Morel sử dụng trong bài báo của ông về nuôi cấy chồi đỉnh (Morel, 1974).

PLB là một cụm nhỏ có tổ chức, có khả năng sinh ra nhiều điểm tăng trưởng bất định. Các điểm này có thể tạo ra nhiều PLB mới hay phát triển thành chồi non có lá. Cùng với đặc điểm dễ dàng trong nuôi cấy (thao tác, phát triển…) nên PLB thường được dùng làm nguồn nguyên liệu để nhân nhanh.

PLB được hình thành từ những cơ quan hay mô thực vật sau:

- *Từ chồi thân:* Năm 1960, Morel nhận thấy rằng có thể nhân giống vô tính lan bằng nuôi cấy mô phân sinh. Từ những năm 1960 - 1963, Morel đã quan sát rằng các chồi thân của lan *Cymbidium* và *Dendrobium* có đường kính khoảng 1 mm và có vài lá nguyên thủy sẽ sinh ra một PLB có rễ (Dương Công Kiên, 2002). Đồng thời, thành công này đã mở đầu cho một hướng mới của nuôi cấy mô tế bào thực vật đó là vi nhân giống (micropropagation).

- *Từ lá:* Sự tạo PLB và chồi non có thể đạt được từ lá của lan *Cattleya* (Champagnat và Morel, 1969) nhưng người ta cũng có thể thu được ở đầu ngoài lá non của lan *Dendrobium, Epodendrum, Laeliocattleya*. Từ đó Churchill và cs. (1971, 1973) đã kết luận rằng sự phát khởi ra dạng PLB đã trải qua trung gian của sự tạo mô sẹo.

- *Từ chóp rễ:* Sự tạo thành PLB và đỉnh sinh trưởng từ chóp rễ đã được quan sát trên cây lan *Clowesia warscewiczii* (Gilberto và Maria, 1996).

Khi đã có PLB, người ta cắt mỗi PLB ra thành từ 3 - 6 phần, mỗi phần sẽ khởi sự đâm chồi và khoảng bốn tuần sau hình thành đến 12 PLB mới.

1.5. Một số yếu tố ảnh hưởng tới sinh trưởng của cây con ở giai đoạn vườn ươm

1.5.1. Ánh sáng và nhiệt độ

Ánh sáng là yếu tố quan trọng ảnh hưởng trực tiếp tới sinh trưởng phát triển của lan thông qua con đường quang hợp. Nhờ ánh sáng mà cây tổng hợp được các chất dinh dưỡng giúp cho cây tăng trưởng nhanh. Nếu thiếu ánh sáng cây sẽ yếu mềm, chậm phát triển và có thể không ra hoa. Nhưng nếu quá nhiều ánh sáng sẽ làm cho cây bị cháy lá hoặc cây con bị chết.

Ánh sáng còn ảnh hưởng tới sự ra hoa của một số loài lan. Hầu hết các loài thuộc chi *Dendrobium, Phaius, Papiopedilum…* nếu thiếu ánh sáng sẽ không ra hoa.

Lan Hoàng thảo cần khoảng 70 - 80% ánh sáng trực tiếp vào mùa hè. Trong điều kiện râm mát cây thường yếu, mọng nước và dễ nhiễm bệnh. Nếu cường độ ánh sáng quá mạnh cây dễ bị cháy lá, héo. Do vậy cần cung cấp đủ ánh sáng cho cây để cây phát triển tốt.

Cây lan chỉ sinh trưởng, phát triển tốt trong khoảng nhiệt độ nhất định. Với các loài lan khác nhau thì khoảng nhiệt độ này cũng không giống nhau. Căn cứ vào nhu cầu nhiệt độ của lan mà chia làm 3 nhóm:

- *Nhóm cây ưa nóng:* Chi *Dendrobium, Phaius…* những loài lan này thường có nguồn gốc nhiệt đới. Chúng chịu được nhiệt độ ban ngày không dưới 21^{o}C và nhiệt độ ban đêm không dưới 18.5^{o}C.

- *Nhóm cây ưa nhiệt độ trung bình:* Bao gồm những loài lan thích hợp với nhiệt độ ban ngày không dưới 14.5^{o}C và ban đêm không dưới 13.5^{o}C như *Vanda, Phaius…*

- *Nhóm cây ưa lạnh:* Bao gồm những loài chịu được nhiệt độ ban ngày không quá 14^{o}C và ban đêm không quá 13^{o}C. Chúng thường xuất xứ ở vùng hàn đới, ôn đới và ở các khu vực núi cao vùng nhiệt đới như chi *Paphiopedilum, Lycaste, Cymbidium…*

Phần lớn các thuộc chi *Dendrobium, Paphiopedilum, Phaius* thích hợp với nhiệt độ ban đêm từ 10 - 16^{o}C và ban ngày 21 - 32^{o}C. Cả ba chi này đều rất đa dạng về chủng loại do vậy với các loài khác nhau sẽ có nhiệt độ tương thích khác nhau.

1.5.2. Độ ẩm

Độ ẩm thích hợp cây sẽ phát triển nhanh hơn, hoa cũng tươi tốt và lâu tàn. Thông thường ẩm độ tương đối tối thiểu 70% thích hợp cho sự tăng trưởng của nhiều loài lan. Mỗi loài lan thì có ẩm độ thích hợp riêng. Tuy nhiên, ẩm độ lý tưởng vẫn là ẩm độ của vùng mà loài lan đó được tìm thấy.

Dendrobium độ ẩm thích hợp vào từ 60 - 80% thì cây sẽ phát triển tốt hơn. Nhóm địa lan như chi *Phaius* và *Paphiopedilum* có nhu cầu về độ ẩm cao hơn.

1.5.3. Giá thể

Đây là một trong những yếu tố quan trọng giúp cây sinh trưởng phát triển tốt. Giá thể trồng lan nói chung và lan Hoàng thảo nói riêng có thể chọn là than hoa, xơ dừa, sỏi nhẹ… đây là những giá thể dễ kiếm. Tuy nhiên, để cây phát triển tốt cần lựa chọn những loại giá thể thích hợp hoặc phối hợp các loại giá thể cho phù hợp với từng giai đoạn sinh trưởng của cây. Giá thể được coi là tốt khi mà nó có khả năng giữ ẩm tốt nhưng có độ thông thoáng nhất định giúp cho cây không bị úng. Đối với các loài thuộc chi *Dendrobium* yêu cầu giá thể thông thoáng. Nhóm địa lan chi *Phaius* và *Paphiopedilum* có thể chịu được giá thể giữ nước cao hơn nhưng cũng cần loại giá thể thoáng khí và thoát nước. Về mặt kinh tế giá thể cũng cần bền với thời gian để giảm chi phí thay giá thể.

1.5.4. Dinh dưỡng

Các loài thực vật nói chung và các loài lan nói riêng thì yêu cầu một lượng dinh dưỡng nhất định để sinh trưởng phát triển. Nhìn chung, các loài lan tuy không đòi hỏi một lượng lớn dinh dưỡng nhưng phải đầy đủ các thành phần dinh dưỡng: các nguyên tố khoáng đa lượng, vi lượng và vitamin. Nếu đủ dinh dưỡng cây sẽ mau lớn, ra hoa nhiều, hoa to hơn. Tùy từng giai đoạn sinh trưởng mà nhu cầu đối với các thành phần dinh dưỡng có khác nhau.

Tùy theo từng loại lan mà nhu cầu phân bón sẽ khác nhau. Đối với loại thân đứng thuộc nhóm địa lan như chi Hạc đính và Lan Hài thì yêu cầu về dinh dưỡng cao, vì thế chúng cần rất nhiều phân bón và có thể dùng rất nhiều dạng phân bón khác nhau. Còn ở loại phong lan như chi Hoàng thảo thì nhu cầu về phân ít hơn nên phải sử dụng ở nồng độ thật loãng. Chi Hoàng thảo cần nhiều phân bón vào mùa hè hơn là mùa đông. Ta nên dùng phân NPK 20-20-20 hoặc NPK 15-15-15 để bón phân quanh năm và NPK 6-30-30 để kích thích cho ra hoa. Lượng phân bón quá nhiều là không cần thiết vì ở hàm lượng cao cây dễ bị cháy lá và cháy rễ cây.

Thảo luận từ các vấn đề tổng quan:

Qua tổng quan các nghiên cứu trong và ngoài nước có liên quan, cho thấy rằng Lan có vai trò quan trọng trong đời sống con người được nhiều nhà khoa học trong nước và quốc tế quan tâm nghiên cứu như: thành phần loài, thẩm mỹ, hương liệu, dược liệu…

Đối với Tây Nguyên, một vùng đất được cho rằng là "trung tâm đa dạng Lan của Việt Nam" có thành phần các loài Lan tăng dần lên theo thời gian và có nhiều loài Lan đặc hữu, quý hiếm, có giá trị kinh tế cao đang bị khai thác ngày càng nhiều, vì thế cần có những nghiên cứu về nhân giống để có thể phát triển, sử dụng và bảo tồn bền vững nguồn tài nguyên quý giá này.

Xuất phát từ cơ sở đó, cần nghiên cứu phát triển, sử dụng và bảo tồn bền vững 05 loài Lan (*Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis* và *Phaius tankervilleae*) đặc hữu,

quý hiếm và có giá trị kinh tế, phục vụ phát triển kinh tế - xã hội tại Lâm Đồng - Tây Nguyên là việc làm quan trọng nhằm giúp bảo tồn nguồn gen của các loài Lan này, đồng thời có thể góp phần phục vụ phát triển kinh tế - xã hội tại Lâm Đồng - Tây Nguyên. Một số vấn đề liên quan cần được chú trọng nghiên cứu gồm:

1. Phát triển được 05 loài lan đặc hữu, quý hiếm và có giá trị kinh tế và giới thiệu sản phẩm du lịch về hoa lan của Lâm Đồng - Tây Nguyên.

2. Nhân giống 05 loài lan đặc hữu, quý hiếm và có giá trị kinh tế phục vụ cho công tác bảo tồn nguồn gen và khai thác bền vững ở Tây Nguyên.

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và nội dung nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

05 loài Lan (*Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis* và *Phaius tankervilleae*). Các loài lan nay được thu thập ngoài tự nhiên ở Tây Nguyên về trồng tại vườn Bảo tồn lan của Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

Theo Nghị định số 06/2019/NĐ - CP ngày 22/01/2019 của Chính phủ về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm, (loài *Paphiopedilum villosum,* thuộc nhóm IA) các loài (*Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Phaius baolocensis* và *Phaius tankervilleae*, thuộc nhóm IIA).

2.1.2. Nội dung nghiên cứu

Nội dung nghiên cứu I: Điều tra hiện trạng địa điểm xây dựng mô hình; thu thập, khảo sát một số đặc điểm sinh thái học của 05 loài Lan (*Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis* và *Phaius tankervilleae*).

Nội dung nghiên cứu II: Nghiên cứu các biện pháp nhân giống 05 loài Lan (*Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis* và *Phaius tankervilleae).*

Nội dung nghiên cứu III: Nghiên cứu quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau ống nghiệm và các biện pháp kỹ thuật chăm sóc cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã, dưới tán rừng tự nhiên.

Nội dung nghiên cứu IV: Đề xuất mô hình trồng lan bán hoang dã.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp cho nội dung 1: Điều tra hiện trạng địa điểm xây dựng mô hình; thu thập, khảo sát một số đặc điểm sinh thái học của 05 loài Lan *(Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis* và *Phaius tankervilleae)*.

- Đánh giá đặc điểm thực vật học: Sử dụng phương pháp hình thái so sánh, giải phẫu thực vật...

- Tham khảo các tài liệu, thu thập thông tin thực địa đặc điểm sinh thái của môi trường tại địa điểm xây dựng mô hình:

+ Đai cao: Đai cao được xác định bằng dụng cụ GPS.

+ Ánh sáng: Được đo thông qua độ tàn che.

+ Độ dày tầng thảm mục: Đo bằng thước.

+ Kiểu thảm: Dựa vào yếu tố sinh thái của môi trường và tính chất quần xã.

- Đánh giá đặc điểm sinh thái học của loài: Xác định sinh cảnh, điều kiện nhiệt độ, độ ẩm… thích hợp cho sự phát triển của từng loài.

2.2.2. Phương pháp cho nội dung 2: Nghiên cứu các biện pháp nhân giống 05 loài Lan *(Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis* và *Phaius tankervilleae)*

- Mẫu được sử dụng trong các thí nghiệm là đoạn thân, chồi ngủ, phát hoa, quả hoặc củ của 05 loài đang được trồng tại vườn Bảo tồn lan của Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

- Sử dụng phương pháp chọn lọc hỗn hợp và chọn lọc cá thể để lựa chọn những mẫu tương đối đồng đều về kích thước, thời gian sinh trưởng và loại bỏ những cá thể có biểu hiện hình thái khác biệt, bị nhiễm sâu bệnh.

2.2.2.1. Thí nghiệm các biện pháp nhân giống sinh dưỡng 05 loài Lan (Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis và Phaius tankervilleae)

a. Thí nghiệm các biện pháp nhân giống sinh dưỡng Hoàng thảo dẹt và Hoàng thảo trần kim

Sử dụng phương pháp ươm kie (*sau mùa hoa đã tàn*) và nghiên cứu ảnh hưởng của chất kích thích IBA đến thời gian nảy chồi của lan.

Sử dụng dụng cụ cắt sắc bén đã được khử trùng và mỗi đoạn thân được cắt dài 10 - 15 cm, chứa 3 - 4 mắt ngủ, dùng parafin hoặc vôi tôi để bôi hai đầu tránh nhiễm nấm bệnh. Các mẫu được xử lý bằng cách lấy bông gòn thấm dung dịch IBA ở các nồng độ ở các nồng độ 0; 0.5; 1.0; 1.5 mg/l lên các mắt ngủ. Đặt các mẫu này nằm ngang trong khay có chứa dớn mút ẩm, ấn nhẹ mẫu sao cho dớn mút phủ lên ½ mẫu, tưới nước giữ ẩm hàng ngày, đặt mẫu ở nơi có đủ ánh sáng mặt trời khuếch tán nhưng không được chiếu trực tiếp vào khay đựng mẫu.

Chỉ tiêu theo dõi: thời gian nảy chồi của mắt ngủ.

b. Thí nghiệm nghiên cứu các biện pháp nhân giống sinh dưỡng Lan Hài vàng

Sử dụng phương pháp tách bụi và tách cây (*sau mùa hoa đã tàn*) đối với Lan Hài vàng.

Nhân giống hoa lan bằng phương pháp tách bụi và tách cây nên tiến hành trước hay sau thời kỳ cây nghỉ, thời điểm thích hợp nhất để tiến hành tách bụi và tách cây vẫn là vào thời điểm cây ngủ đông.

Để thuận tiện cho việc phân gốc cần làm khô giá thể trong chậu nhằm giảm sự ảnh hưởng tới bộ rễ khi trồng. Tuy nhiên, cũng không nên để rễ quá khô vì sẽ ảnh hưởng tới sinh trưởng của cây. Ngoài ra, khi tiến hành phân nhánh cần chuẩn bị đầy đủ các nguyên vật liệu như chậu, giá thể, dụng cụ phân nhánh…

Trước khi tách cây ra khỏi chậu khoảng 5 - 7 ngày nên bón phân để sau khi nhánh tách khỏi cây mẹ, cây gốc có được sức sống đầy đủ, nhanh chóng phục hồi. Khi tách cây thì tay trái tỳ vào thành chậu, tay phải nhấc giá thể khỏi chậu, hoặc dùng ngón trỏ phải đẩy vào lỗ thoát khí ở đáy chậu, nhẹ nhàng đẩy lên, tách giá thể ra khỏi chậu tránh làm tổn thương đến hệ rễ. Sau khi tách nên cắt bỏ những lá bị vàng, những chồi non bị thối trên giả hành và rễ già đã khô.

Sau khi tách khỏi giá thể và chậu lan thì cắt bỏ những rễ già, rễ bị thối rữa, rửa sạch sau đó mang ra nơi thoáng hong khô, sau khi rễ mềm thì tiến hành phân nhánh.

Trước khi phân nhánh, từ những gốc mới nhất, quan sát sắc dịch và độ già non. Khi tách cây hoặc tách bụi chọn những nhánh, bụi to, tìm lấy các nhánh có khoảng cách rộng, dùng tay lắc nhẹ rồi dùng ngón tay cái và ngón trỏ nhẹ nhàng tách nhánh, sau đó dùng kéo đã được khử trùng để cắt. Hai phần được tách ra phải có chồi mới, có thể tự phát triển thành gốc mới. Mỗi phần tách ra nên có từ 2 nhánh, quá ít sẽ không có lợi cho sinh trưởng chồi mới, cây cũng khó ra hoa. Sau khi phân nhánh cần bôi thuốc sát trùng vào miệng vết cắt, không tưới nước vào rễ để tránh làm nhiễm trùng rễ.

Chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ mẫu nảy chồi theo các tháng.

c. Thí nghiệm nghiên cứu các biện pháp nhân giống sinh dưỡng Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu

Sử dụng phương pháp ươm cuống hoa và tách củ (*sau mùa hoa đã tàn*).

Chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ mẫu nảy chồi theo các tháng.

d. Bố trí thí nghiệm và phương pháp xử lý số liệu cho thí nghiệm nghiên cứu các biện pháp nhân giống sinh dưỡng

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên. Mỗi nghiệm thức được tiến hành trên 45 mẫu.

Xử lý số liệu: Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2012.

2.2.2.2. Thí nghiệm nhân giống vô tính bằng phương pháp nuôi cấy mô 05 loài Lan (Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis và Phaius tankervilleae)

Sử dụng kỹ thuật nhân giống *in vitro.*

Vật liệu nuôi cấy: chồi ngủ, hạt của 05 loài Lan đang được trồng tại Vườn Bảo tồn lan của Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

Phương pháp nuôi cấy chồi ngủ được thực hiện đối với các loài *Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum* và *Phaius baolocensis.*

Phương pháp gieo hạt được thực hiện đối với loài *Paphiopedilum villosum* và *Phaius tankervilleae.*

Đối với phương pháp nuôi cấy bằng chồi ngủ, các bước được tiến hành cụ thể như sau:

Công việc 1: Ảnh hưởng của phương pháp khử trùng đến khả năng sống, vô trùng của chồi lan.

Thí nghiệm 1: Nghiên cứu phương pháp khử trùng chồi ngủ

Các chồi ngủ được rửa sạch dưới vòi nước, ngâm trong xà phòng loãng 15 phút rồi rửa sạch xà phòng dưới vòi nước chảy. Sau khi rửa sạch đem mẫu vào tủ cấy tiến hành thí nghiệm theo các công thức:

+ Nghiệm thức 1: Ngâm trong dung dịch H_2O_2 2% và lắc đều trong 5 phút, tráng 2 - 3 lần bằng nước cất vô trùng, tiếp tục lắc trong dung dịch H_2O_2 2% trong 2 phút, tráng sạch nhiều lần bằng nước cất vô trùng. Cấy mẫu vào trong môi trường nuôi cấy.

+ Nghiệm thức 2: Ngâm trong dung dịch $HgCl_2$ 1‰ và lắc đều trong 3 phút, tráng 2 - 3 lần bằng nước cất vô trùng, tiếp tục lắc trong dung dịch $HgCl_2$ 1‰ trong 1 phút, tráng sạch lại bằng nước cất vô trùng. Cấy mẫu vào trong môi trường nuôi cấy.

+ Nghiệm thức 3: Ngâm trong dung dịch Streptomycine 2‰ trong vòng 5 phút, lắc đều và rửa lại bằng nước cất từ 3 - 6 lần. Cuối cùng mẫu được khử trùng bằng $HgCl_2$ 1‰ + vài giọt Tween 80 trong vòng 8 phút và rửa lại bằng nước cất vô trùng.

Mẫu sau khi khử trùng được tiến hành cấy trên môi trường ½MS có bổ sung 0.1 mg/l NAA; 1.0 mg/l BA. Thí nghiệm trên mẫu chồi cây với 3 công thức, bố trí 3 lần lặp lại, mỗi lần 3 mẫu.

Công việc 2: Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của Hoàng thảo trần kim (*D. trankimianum*) trong nuôi cấy *in vitro.*

Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của BA đến khả năng hình thành PLB.

Các PLB được hình thành từ nuôi cấy chồi ngủ sau 30 ngày cấy vào môi trường nuôi cấy MS có bổ sung BA (0; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 mg/l).

Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của BA kết hợp NAA đến khả năng hình thành PLB.

Nồng độ BA tối ưu nhất trong thí nghiệm 2 sẽ được chọn để bổ sung kết hợp với NAA (0.2; 0.5; 1.0; 1.5 mg/l) lên khả năng hình thành PLB.

Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của TDZ kết hợp NAA đến khả năng hình thành PLB.

Tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của TDZ (0.5; 1.0; 1.5; 2.0 mg/l) kết hợp 0.5 mg/l NAA lên sự hình thành PLB.

Thí nghiệm 5: Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ nước dừa (0; 10; 15; 20%) đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro.*

Thí nghiệm 6: Nghiên cứu ảnh hưởng của BA (0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 mg/l) đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro.*

Các thí nghiệm sau sử dụng nồng độ nước dừa thích hợp ở thí nghiệm 5.

Thí nghiệm 7: Nghiên cứu ảnh hưởng của dịch nghiền khoai tây, chuối, cà rốt (60 g/l môi trường) lên sự hình thành và sinh trưởng chồi cây *in vitro.*

Thí nghiệm 8: Ảnh hưởng của than hoạt tính (0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 g/l) đến khả năng tái sinh rễ *in vitro.*

Thí nghiệm 9: Nghiên cứu ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng (IAA, IBA, NAA) ở các nồng độ 0; 0.3; 0.5; 1.0 mg/l đến khả năng tái sinh rễ *in vitro.*

Công việc 3: Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của Hoàng thảo dẹt (*D. nobile*) trong nuôi cấy *in vitro.*

Thí nghiệm 10: Nghiên cứu ảnh hưởng của BA kết hợp NAA đến khả năng hình thành PLB.

Sau 30 ngày vào mẫu, chọn những mẫu sạch nấm bệnh được chuyển vào môi trường nuôi cấy MS có bổ sung BA (0; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 mg/l) kết hợp NAA (0.2; 0.5; 1.0 mg/l).

Thí nghiệm 11: Ảnh hưởng của TDZ kết hợp NAA đến khả năng hình thành PLB.

Bổ sung riêng lẽ TDZ (0.05; 0.1; 0.5; 1.0; 1.5 mg/l) hoặc kết hợp 0.5 mg/l vào môi trường nuôi cấy.

Thí nghiệm 12: Nghiên cứu ảnh hưởng của BA (0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 mg/l) đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro.*

Các thí nghiệm sau sử dụng nồng độ nước dừa thích hợp ở thí nghiệm 5.

Thí nghiệm 13: Nghiên cứu ảnh hưởng của dịch nghiền khoai tây, chuối, cà rốt ở hàm lượng 100 g/l lên sự hình thành và sinh trưởng chồi cây *in vitro.*

Thí nghiệm 14: Nghiên cứu ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng (IAA, IBA, NAA) ở các nồng độ 0; 0.5; 1.0; 1.5 mg/l đến khả năng tái sinh rễ *in vitro.*

Công việc 4: Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của Lan Hài vàng (*Paphiopedilum villosum*) trong nuôi cấy *in vitro.*

Thí nghiệm 15: Nghiên cứu ảnh hưởng của dịch nghiền khoai tây, chuối, cà rốt ở hàm lượng 60 g/l môi trường lên sự hình thành và sinh trưởng chồi cây *in vitro.*

Thí nghiệm 16: Nghiên cứu ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng (IAA, IBA, NAA) ở các nồng độ 0; 0.5; 1.0; 1.5 mg/l đến khả năng tái sinh rễ *in vitro.*

Công việc 5: Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của Hạc đính bảo lộc *(Phaius baolocensis)* và Hạc đính nâu *(Phaius tankervilleae)* trong nuôi cấy *in vitro.*

Thí nghiệm 17: Ảnh hưởng của BA đến khả năng hình thành PLB của Hạc đính bảo lộc.

Các PLB được hình thành từ nuôi cấy chồi ngủ sau 30 ngày cấy vào môi trường nuôi cấy MS có bổ sung BA (0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 mg/l).

Thí nghiệm 18: Ảnh hưởng của BA kết hợp NAA đến khả năng hình thành PLB của Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu.

Nồng độ BA tối ưu nhất trong thí nghiệm 17 sẽ được chọn để bổ sung kết hợp với NAA (0.5; 1.0; 1.5 mg/l) lên khả năng hình thành PLB.

Thí nghiệm 19: Ảnh hưởng của TDZ kết hợp NAA đến khả năng hình thành PLB của Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu.

Tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của TDZ (0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 mg/l) kết hợp NAA (0; 1.0 mg/l) lên sự hình thành PLB.

Thí nghiệm 20: Nghiên cứu ảnh hưởng của BA (0; 0.5; 1.0 mg/l) lên sự tái sinh chồi của Hạc đính bảo lộc.

Thí nghiệm 21: Nghiên cứu ảnh hưởng của Kin (0; 0.5; 1.0 mg/l) lên sự tái sinh chồi của Hạc đính bảo lộc.

Thí nghiệm 22: Nghiên cứu ảnh hưởng của BA (0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 mg/l) kết hợp với Kin (0; 1.0 mg/l) lên sự tái sinh chồi *in vitro* Hạc đính nâu.

Thí nghiệm 23: Nghiên cứu ảnh hưởng của dịch nghiền củ quả ở hàm lượng 60 g/l môi trường lên sự tái sinh chồi *in vitro* của Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu.

Thí nghiệm 24: Nghiên cứu ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng (IAA, IBA, NAA) ở các nồng độ 0; 0.3; 0.5; 1.0 mg/l đến khả năng tái sinh rễ *in vitro* của Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu.

Đối với phương pháp gieo hạt, các bước được tiến hành cụ thể như sau:

Sau khi hái, trái lan phải được rửa sạch và khử trùng mặt ngoài bằng cách:

Dùng gòn rửa trái trong nước xà phòng loãng hay nước có thêm vài giọt Tween 80, để dưới vòi nước chảy khoảng 30 phút.

Ngâm vào cồn 70^o nếu trái còn xanh, trái chín già không cần nhúng vì cồn sẽ làm trái khô nứt ra ngay, sau đó trái được khử trùng trong dung dịch hypochlorit calci 10% hay hypochroit natri 5% trong 20 phút hoặc clorua thủy ngân 0.1% trong 5 đến 10 phút.

Rửa lại bằng nước cất vô trùng (3 lần), tất cả các thao tác được thực hiện trong tủ cấy vô trùng. Sau đó được gieo trên môi trường đã chuẩn bị sẵn.

Sau đó, các thí nghiệm được tiến hành tương tự với phương pháp nuôi cấy bằng chồi ngủ.

Điều kiện thí nghiệm

Nhiệt độ 25^{o}C ± 2^{o}C.

Độ ẩm trung bình 80 - 85%.

Cường độ chiếu sáng là 35 µmol m^{-2} s^{-1}.

Thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày.

Chỉ tiêu theo dõi

Số PLB/số mẫu cấy = ΣPLB/Σmẫu cấy (đối với từng nghiệm thức).

Tỷ lệ mẫu tạo PLB (đối với các nghiệm thức).

Tỷ lệ ra rễ sau 60 ngày, số rễ/chồi, chiều dài rễ.

Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Kết quả được xử lý bằng phần mềm Excel 2010 và phần mềm phân tích thống kê SPSS 16.0 theo phương pháp Ducan test với Ducan's test (α = 0.05).

Các thí nghiệm được bố trí chặt chẽ theo phương pháp thăm dò mẫu cấy khởi đầu, môi trường và điều kiện nuôi cấy tối ưu. Các phương pháp thực hiện trong đề tài đều có sự tham khảo các tư liệu trong và ngoài nước để tiến hành.

2.2.3. Phương pháp cho nội dung 3*:* Nghiên cứu quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau ống nghiệm và các biện pháp kỹ thuật chăm sóc cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã, dưới tán rừng tự nhiên.

- Phương pháp ra cây và biện pháp xử lý trước khi ra cây tại vườn ươm.

- Thí nghiệm ảnh hưởng của một số yếu tố tới sinh trưởng và phát triển của cây con sau ống nghiệm.

+ Ảnh hưởng của các loại giá thể tới sinh trưởng và phát triển của cây con sau ống nghiệm.

Sử dụng các loại giá thể là đất sạch Eco, dớn mút, bột xơ dừa, trấu hun phối trộn các tỷ lệ khác nhau.

Số cây thí nghiệm: 60 cây x 4 công thức x 3 lần lặp lại = 720 cây.

Chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ sống, số rễ, chiều dài rễ.

+ Ảnh hưởng của các loại phân bón tới sinh trưởng và phát triển của cây con sau ống nghiệm.

Sử dụng các loại phân bón khác nhau như Antonik, Growmore, Yogen N02, Đạm cá...

Số cây thí nghiệm: 60 cây x 4 công thức x 3 lần lặp lại = 720 cây.

Chỉ tiêu theo dõi: chiều cao cây và số lá.

+ Ảnh hưởng của độ che sáng tới sinh trưởng và phát triển của cây con sau ống nghiệm.

Tiến hành thí nghiệm ở 3 độ che sáng lần lượt là 50% - 60%; 60% - 70%; 70% - 80%.

Số cây thí nghiệm: 60 cây x 3 công thức x 3 lần lặp lại = 540 cây.

Chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ sống, chiều cao cây và số lá.

+ Ảnh hưởng của độ ẩm tới sinh trưởng và phát triển của cây con sau ống nghiệm.

Tiến hành thí nghiệm với 4 mức độ ẩm là (30% - 40% (Tưới phun sương 1 lần/ngày), 50% - 60% (Tưới phun sương 2 lần/ngày), 70% - 80% (Tưới phun sương 3 lần/ngày), trên 90% (Tưới phun sương 4 lần/ngày).

Số cây thí nghiệm: 60 cây x 4 công thức x 3 lần lặp lại = 720 cây.

Chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ sống, trạng thái phát triển của cây.

+ Phương pháp chăm sóc và phòng trừ sâu bệnh hại cây giống tại vườn ươm theo phương pháp thí nghiệm đồng ruộng (Phạm Chí Thành, 1998).

- Các biện pháp kỹ thuật chăm sóc cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã, dưới tán rừng tự nhiên.

+ Phương pháp xử lý số liệu: Kết quả được xử lý bằng phần mềm Excel 2010 và phần mềm phân tích IRRISTAT 5.0.

2.2.4. Phương pháp cho nội dung 4: Xây dựng mô hình trồng lan bán hoang dã

- Đánh giá chất đất, nguồn nước, thảm thực vật và điều kiện khí hậu thổ nhưỡng tại vùng triển khai mô hình phù hợp với điều kiện sinh trưởng phát triển của loài, đánh giá về tiềm năng của đơn vị hợp tác và xã hội nơi triển khai mô hình.

- Phát dọn và xử lý thực bì

- Làm đất, đào hố, bón phân

- Bốc xếp vận chuyển và kỹ thuật trồng

- Chỉ tiêu theo dõi tại các mô hình:

+ Theo dõi định kỳ 30 ngày/lần và 60 ngày/lần.

+ Đánh giá sự sinh trưởng và phát triển.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát địa điểm xây dựng mô hình và đặc điểm sinh thái của 05 loài Lan (*Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis* và *Phaius tankervilleae)*

Qua kết quả điều tra khảo sát thực địa, chúng tôi đã chọn 3 địa điểm triển khai các mô hình trồng lan bán hoang dã đó là: Vườn thực vật Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, khu du lịch Hồ Tuyền Lâm và Vườn quốc gia Bidoup - Núi Bà. Qua đó chúng tôi phát hiện một loài mới tại khu vực núi Bidoup và đã công bố trên tạp chí Phytotaxa 369 (1): 001 - 014. 2018, có tên khoa học *Bulbophyllum sonii* Aver. & N.V.Duy.

Theo Phan Kế Lộc (1985) và kết quả điều tra, chúng tôi chọn kiểu rừng rậm nhiệt đới thường xanh mưa mùa ở địa hình núi thấp để triển khai mô hình như sau:

3.1.1. Mô hình tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên

Địa điểm chọn để triển khai mô hình nằm trong khuôn viên Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Phường 7, Thành phố Đà Lạt, nơi có độ cao trung bình 1.500 m so với mực nước biển, khí hậu nhiệt đới vùng núi cao ôn hòa, dịu mát quanh năm.

Thực vật ở đây chủ yếu là thảm thực vật cây lá kim (Thông ba lá) với các loại cây thuộc họ Dẻ (Fagaceae) ở tầng dưới. Khu vực này cũng được trồng bổ sung bởi các loài cây gỗ nhỏ như Mai anh đào (*Prunus cerasoides*), Mỡ (*Manglietia conifera*), Phượng tím (*Jacaranda mimosifolia*), Bách xanh (*Calocedrus macrolepis*) và Sổ dả (*Saurauia nepaulensis*). Các loài cây trồng dưới tán sẽ là đối tượng được sử dụng cho mục đích trồng thử nghiệm 2 loài phong lan *Dendrobium nobile* và *Dendrobium trankimianum*.

Khu vực lựa chọn triển khai mô hình chủ yếu là nhóm đất mùn, nơi có độ dày tầng thảm mục từ 5 - 10 cm, thích hợp cho sự phát triển của các loài *Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis* và *Phaius tankervilleae* (Hình 3.1).

Hình 3.1. Địa điểm và thảm thực vật khu vực triển khai mô hình tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

3.1.2. Mô hình tại Khu du lịch hồ Tuyền Lâm

Địa điểm chọn để triển khai mô hình thuộc tiểu khu 157, nằm trong Khu du lịch thác Bảo Đại nhằm dễ dàng theo dõi và quản lý.

Thực vật ở đây thuộc các họ Côm (Elaeocarpaceae: *Elaeocarpus),* Đỗ quyên (Ericaceae: *Rhododendron Vaccinium),* Dẻ (Fagaceae: *Castanopsis, Lithocarpus, Quercus),* Sau sau (Hamamelidaceae: *Rhodoleia, Symingtonia),* Hồi (Illiciaceae *Illicium),* Long não (Lauraceae: *Actinodaphne, Cinnamomum, Cryptocarya, Lindera, Litsea, Machilus, Neolitsea, Notaphoebe, Phoebe),* Ngọc lan (Magnoliaceae *Magnolia, Michelia, Talauma),* Dâu tằm (Moraceae: *Ficus),* Sim *(*Myrtaceae: *Syzygium),* Hoa hồng (Rosaceae: *Eriobotrya, Pyrus, Sorbus, Photinia, Pygeum),* Chè (Theaceae: *Eurya, Pyrenaria, Schima, Gordonia)*… Đây là kiểu rừng tái sinh với một số ít Thông ba lá xen lẫn ở tầng trên. Ngoài cây thông thì hầu hết các loài khác đều phù hợp cho việc trồng thử nghiệm hai loài *Dendrobium nobile* và *Dendrobium trankimianum.*

Theo kết quả điều tra lập địa của Phân viện điều tra quy hoạch rừng II, đất ở đây chủ yếu là đất vàng xám phát triển trên đá mẹ Granit và Dacid, độ phì của đất tương đối tốt, diện tích đất bị thoái hóa không đáng kể. Thành phần cơ giới biến động từ thịt nặng đến sét, tầng đất dày và khá sâu. Một số diện tích có độ dốc lớn nên dễ bị rửa trôi và xói mòn trong mùa mưa, khả năng giữ nước và dinh dưỡng không cao. Những vị trí có độ đốc thấp, độ phì nhiêu cao sẽ thử nghiệm trồng *Paphiopedilum villosum.* Vị trí có độ đốc cao hơn, lớp đất bị rửa trôi nhiều được thử nghiệm trồng 2 loài *Phaius baolocensis* và *Phaius tankervilleae* (Hình 3.2).

Hình 3.2. Địa điểm và thảm thực vật khu vực triển khai mô hình tại Khu du lịch Hồ Tuyền Lâm.

3.1.3. Mô hình tại Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà

Địa điểm chọn để triển khai mô hình thuộc tiểu khu 91, nằm ở trung tâm Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà nhằm dễ dàng theo dõi và quản lý.

Địa điểm triển khai mô hình có độ cao dao động 1.400 - 1.700 m. Đây cũng là bậc địa hình có diện tích phổ biến nhất trong khu vực nghiên cứu. Ở đai độ cao này, địa hình có sự đan xen giữa các sườn núi và thung lũng khá rộng, có khi tới vài trăm mét. Độ dốc sườn cũng thay đổi liên tục theo không gian. Trên sườn dốc, độ dốc thường dao động từ 12 - 18^o, trong khi đó, địa hình thung lũng thường có độ dốc dưới 8^o. Tuy vậy, đặc điểm này còn phụ thuộc vào kích thước thung lũng giữa các sườn núi.

Thực vật ở đây rất đa dạng với kiểu Rừng lá rộng thường xanh. Kiểu rừng này rất phong phú về chủng loài cây và đầy đủ cấu trúc 5 tầng, cùng với những loài dây leo, phụ sinh và ký sinh. Cấu trúc tầng tự nhiên đầy đủ của rừng ẩm kín lá rộng thường xanh nhiệt đới gồm có: Tầng vượt tán: cây gỗ cao đến 40 - 50 m, thuộc họ Thông (Pinaceae), họ Dâu tằm (Moraceae), họ Đậu (Fabaceae)… Tầng chính (Tầng tán rừng): phần lớn là những loài cây thường xanh cao 20 - 30 m, thuộc các họ Dẻ (Fagaceae), họ Quế (Lauraceae), họ phụ Điệp (Caesalpinoideae), họ phụ Trinh nữ (Mimosoideae), họ phụ Cánh bướm (Papilionoideae), họ Nhãn (Sapindaceae), họ Xoan (Meliaceae), họ Dạ hợp (Magnoliaceae), họ Trám (Burseraceae). Tầng dưới tán: cao từ 8 - 15 m, mọc rải rác dưới tán rừng, thuộc các họ Bứa (Clusiaceae), họ Sếu (Ulmaceae), họ Đậu khấu (Myristicaceae), họ Mãng cầu (Annonaceae), họ Hồng quân (Flacourtiaceae). Tầng cây bụi (Tầng thảm xanh): cao từ 2 - 8 m và tầng cỏ/tầng đáy rừng, cao không quá 2 m. Tầng chính và tầng dưới tán được lựa chọn cho trồng thử nghiệm các loài phong lan.

Khu vực này có tầng thảm mục dày và lớp đất mùn bề mặt cũng khá dày thuận lợi cho trồng các loài Lan Hài và Lan Hạc đính (Hình 3.3).

Hình 3.3. Địa điểm và thảm thực vật khu vực triển khai mô hình tại Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà.

3.1.4. Đặc điểm hình thái và sinh thái của các loài lan nghiên cứu

3.1.4.1. Dendrobium nobile Lindl. Gen. Sp. Orchid. Pl. 79 1830

Đồng nghĩa: Dendrobium nobile var. *alboluteum* Huyen & Aver.; *Dendrobium nobile* var. *formosanum* Rchb.f.; *Dendrobium nobile* var. *nobilius* Rchb.f.; *Dendrobium nobile* f. *nobilius* (Rchb.f.) M. Hiroe; *Dendrobium nobile* var. *nobilus* Burb.; *Dendrobium nobile* var. *pallidiflorum* Hook.

Tên tiếng Việt: Hoàng thảo dẹt.

Đặc điểm hình thái: Cây sống phụ sinh. Thân dài 30 - 60 cm, hình trụ, dày 1.5 - 1.8 cm, hình chùy dẹp bên, lóng dài 2.5 - 3.6 cm, thân già thường dày lên và thắt lại luân phiên nhau. Lá hình mác, dài 6 - 10 cm, rộng 2.5 - 4 cm, đỉnh chia hai thùy lệch. Cụm hoa bên, từ 2 - 4 hoa, mọc trên thân còn lá, lá đài bắc hình bầu dục, dài 0.5 cm. Hoa có đường kính 5 - 6 cm, các lá đài và cánh hoa màu trắng có vết tím, cuống hoa và bầu dài 3 - 4 cm, các lá đài hình mác rộng, đỉnh tù, dài 3.3 - 3.5 cm, rộng 0.8 - 1 cm. Cằm dài 0.6 cm, đỉnh tù tròn. Cánh hoa hình mác, đỉnh nhọn, dài 2.5 - 3 cm, rộng 0.8 - 1 cm. Cánh môi hình phễu, viền trắng, giữa môi có một đốm lớn màu tím, khi trải phẳng có hình bầu dục dài 2.6 - 3 cm, rộng 2.5 - 2.6 cm. Cột màu xanh nhạt cao 0.4 - 0.6 cm, tuyến mật hình khe; răng cột hơi cong đỉnh nhọn. Nắp bao phấn màu tía, hình mũ cao phủ nhũ mịn. Nở hoa vào khoảng tháng 4 - 5.

Đặc điểm sinh thái và phân bố: Hoàng thảo dẹt thường mọc phụ sinh trên thân các cây gỗ hoặc trên đá ở các loại hình rừng kín thường xanh và rừng cây lá rộng ẩm trên núi đá vôi. Cây đặc biệt ưa ẩm và chịu bóng, sinh trưởng phát triển tốt ở những vùng núi có nhiệt độ trung bình năm từ 15 đến 22^{o}C. Hoàng thảo dẹt phân bố tương đối rộng ở nhiều nước châu Á như Trung Quốc, Lào, Thái Lan, Ấn Độ, Mianma, Butan, Nepal... Việt Nam, Hoàng thảo dẹt có ở các tỉnh miền núi phía Bắc vào đến Tây Nguyên.

Hiện trạng và giá trị sử dụng: Hoàng thảo dẹt là loài cho hoa to, đẹp, hương thơm nên rất được ưa chuộng. Bên cây giá trị về mặt thẩm mỹ, loài hoa này còn có giá trị dược liệu. Theo tác giả Đỗ Tất Lợi (2004), Hoàng thảo dẹt thường được dùng chữa những bệnh sốt nóng, khô cổ, khát nước, người háo bứt rứt khó chịu. Nghiên cứu về dược lý hiện đại cho biết, Hoàng thảo dẹt có tác dụng tốt về chống mệt mỏi và chống chịu ngạt oxy, lợi mật, tư dưỡng can âm, là dược thảo tốt điều trị các bệnh gan, mật, chữa trị viêm gan, viêm túi mật, sỏi. Ngoài ra, Hoàng thẻo dẹt có khả năng giúp cho gân cốt khỏe, khớp nối thanh thoát, có hiệu quả kháng phong thấp; đồng thời loài này còn có hoạt tính giúp tăng cường Insulin, giảm đường huyết, mỡ máu giúp máu lưu thông, xúc tiến tuần hoàn, giãn huyết quản, giảm cholesterol và triglyceride.

Chính những giá trị to lớn mà chúng mang lại nên loài này bị khai thác quá mức vì mục đích thương mai.

Hình 3.4. Hoàng thảo dẹt - *Dendrobium nobile* Lindl.

3.1.4.2. Dendrobium trankimianum T. Yukawa. Ann. Tsukuba Bot. Gard. 23: 21 2004

Tên tiếng Việt: Hoàng thảo trần kim.

Đặc điểm hình thái: Phong lan thân dài 30 - 40 cm, gốc hóa gỗ, đầy lông cứng. Lá có bẹ ôm thân đầy lông cứng, lá xếp thành 2 dãy, dài 7 - 10 cm, rộng 1.5 - 2 cm, chót hình tim lệch. Các cụm hoa từ 1 - 2, mọc ở các đốt gần ngọn, khi hoa nở rộng từ 3.5 - 5 cm, cánh hoa hình elip, đặc điểm của loài này là hoa dày, cánh hoa lõm tròn và sắc nhọn ở đỉnh, đài hoa và cánh hoa màu trắng, lưỡi màu đỏ hơi cam. Thùy bên có gân màu đỏ, cuống bầu nhụy màu xanh nhạt. Hoa nở vào mùa xuân.

Đặc điểm sinh thái và phân bố: Hoàng thảo trần kim được công bố lần đầu tiên vào năm 2004. Khu vực Khánh Vĩnh, Khánh Hòa - Lâm Đồng. Chúng mọc trên các cây cao ở rừng thường xanh lá rộng và hỗn hợp thường xanh hoặc trên

các phiến đá. Đặc biệt trên các đỉnh núi ở độ cao 1.000 - 1.900 m. Hoa nở vào mùa xuân.

Hiện trạng và giá trị sử dụng: Hoàng thảo trần kim là một trong những lan rừng đẹp nhưng phân bố hẹp. Nếu không có biện pháp bảo vệ kịp thời có thể lâm vào nguy cơ tuyệt chủng. Theo Averyanov (2016) thì Hoàng thảo trần kim được xếp vào hạng CR (Cực kỳ nguy cấp).

Hình 3.5. Hoàng thảo trần kim - *Dendrobium trankimianum* T. Yukawa.

3.1.4.3. Paphiopedilum villosum (Lindl.) Stein. Orchid. - Buch 490 1892

Đồng nghĩa: Cordula villosa (Lindl.) Rolfe; *Cypripedium villosum* Lindl.; *Paphiopedilum macranthum* Z.J. Liu & S.C. Chen; *Paphiopedilum villosum* (Lindl.) Pfitzer; *Paphiopedilum villosum* f. *aureum* Braem; *Paphiopedilum villosum* var. *fuscoroseum* Aver.; *Paphiopedilum villosum* f. *fuscoroseum* (Aver.) O. Gruss & M. Wolff.

Tên tiếng Việt: Lan Hài vàng.

Đặc điểm hình thái: Cây phụ sinh hoặc hiếm khi mọc trên đá, thường ít nhiều tạo thành các đám. Lá 4 - 5, hình lưỡi dài hẹp, nhọn đến có mũi nhọn tại 2 thùy đỉnh không bằng nhau, dài 14 - 42 x 2.5 - 4 cm, xanh nhạt ở mặt dưới, đốm tía ở gốc, mép phần gốc có lông rìa. Cụm hoa gần thẳng đứng cho tới cong vòng cung hoặc treo, 1 hoa; cuống cụm hoa dài 7 - 24 cm, xanh, thường đốm tía, có các lông tơ dài từ trắng tới tía thẫm; lá hoa hình bầu dục, tù, dài 3.7 - 6.5 cm, rộng 3 - 3.8 cm, xanh, đốm màu hạt dẻ, nhẵn. Hoa rộng 7.5 - 13.5 cm; lá đài lưng trứng hoặc xanh về phía giữa với phần trung tâm màu nâu thẫm bóng loáng tù, dài 4.5 - 7 cm, rộng 3 - 4.6 cm với mép ở gốc uốn cong; Lá đài hợp ôm lấy bầu, hình trứng hẹp, gần nhọn, dài 3.8 - 7.6 cm, rộng 1.8 - 2.6 cm. Các cánh hoa cong vào trong, hình trứng ngược thìa, lõm rộng hoặc có 3 răng rộng, tròn ở đỉnh, dài 4 - 6.8 cm, rộng 3 - 3.8 cm nâu đỏ bóng, thường có một vạch nâu thẫm ở giữa, thường nâu vàng dọc theo phần dưới; môi màu son, lẫn với màu hồng hoặc đỏ, có gân màu nâu thẫm; nhị lép hình tim ngược - trứng ngược, cụt đầu, dài khoảng 16 mm, rộng 14 mm, có các hạt lồi nhỏ, nhiều lông với một núm giữa bóng loáng; bầu và cuống có mặt cắt ngang hình tam giác, dài dài 3 - 6 cm, xanh sáng, phủ lông trắng tới tía dày đặc. Mùa hoa tháng 4 - 6.

Đặc điểm sinh thái và phân bố: Lan Hài vàng thích hợp kiểu khí hậu nhiệt đới gió mùa vùng núi. Lượng mưa trung bình năm dao động từ 1.800 - 3.900 mm. Mọc trong rừng nguyên sinh ẩm, cây lá rộng và rừng hỗn giao ở độ cao 1.400 - 2.000 m. Thường gặp chúng phụ sinh ở các hốc mùn trên các cây gỗ cao dọc theo các đỉnh núi ở trong rừng mây mù rêu ẩm, loài này đôi khi còn có thể gặp trên các tảng đá granit hoặc các đá axit silicat khác.

Việt Nam loài này phân bố từ vùng núi phía Bắc và Tây Nguyên Chư Pah (Gia Lai), núi Bidoup huyện Lạc Dương (Lâm Đồng), núi Hòn Giao (Khánh Hòa).

Hiện trạng và giá trị sử dụng: Là loài quý hiếm, có hoa đẹp được sử dụng làm cảnh. Hiện nay, Lan Hài bị khai thác trong tự nhiên với số lượng lớn, với giá rất cao để làm cây cảnh. Lan Hài với hình dáng khá đặc biệt đã trở thành loại cây trang trí có tầm quan trọng trong đời sống ở các nước Châu Á và Châu Âu. Lan Hài vàng được đưa vào Sách đỏ Việt Nam phân hạng: EN B1+2b,c,e.

Theo Nghị định số 06/2019/NĐ - CP ngày 22/01/2019 của Chính phủ về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm và thực thi Công ước về buôn bán quốc tế các loài động vật, thực vật hoang dã nguy cấp. Loài này được xếp vào nhóm IA.

Hình 3.6. Lan Hài vàng - *Paphiopedilum villosum* (Lindl.) Stein.

3.1.4.4. Phaius baolocensis V. D. Nong, T. Chen & X. D. Zhang. Adansonia 34 (2): 251 - 255 2012

Tên tiếng Việt: Hạc đính bảo lộc, Hạc đính vàng.

Đặc điểm hình thái: Thân thảo, sống ở đất, mọc thẳng đứng, cao 60 - 80 cm. Giả hành hình nón, hình trứng, hoặc hình cầu, dài 7 - 8 cm, đường kính 3 - 4 cm. 2 - 5 lá, ở phần trên của giả hành; lưỡi xanh, hình elip - mũi mác, 45 - 70 x 5 - 8 cm, nhẵn, nhọn ở đỉnh, với 3 (- 5) gân nổi rõ; cuống lá dài 15 - 20 cm. Cụm hoa mọc từ giả hành hoặc từ nách lá, vượt chiều cao của lá, cao 60 - 100 cm, 10 - 15 hoa thưa thớt, nhẵn; lá bắc thường không bền, hình mũi mác, 5 - 6.5 x 1.5 - 2.3 cm, nhẵn. Hoa rũ xuống, nhiều hoa nở lớn đường kính 9 - 10 cm, cuống và bầu nhụy dài 4 - 4.5 cm, nhẵn; đài hoa và cánh hoa bên màu trắng, màu xanh hơi vàng bên trong. Cánh đài lưng thuôn dài hình mũi mác, 5 - 5.5 x 1.8 - 1.9 cm, nhẵn, mũi nhọn; cánh đài bên hình elip 4.5 - 5 x 1.7 cm, nhọn. Cánh hoa hình elip 5.5 - 6 x 1.5 cm, môi màu vàng nhạt với sọc trắng, trắng ở giữa và vàng nhạt từ mép tiến vào trong, 4 - 4.5 cm x 2.5 cm, hình trứng rộng, 3 thùy nông, thùy bên gần như hình bán nguyệt, 1.8 x 0.8 cm, và quấn lại, mép lượn sóng và màu vàng hơi trắng; thùy giữa theo chiều dọc hình chữ nhật, có lông măng ở giữa bên trong, mép lượn sóng và nhăn, đỉnh chia làm 2 thùy; cựa nhỏ cong, vàng hơi trắng, hình trụ, 0.5 - 0.8 x 0.2 cm, đỉnh chia 2 thùy nhỏ không bằng nhau. Cột không có đốm trắng, 2 - 2.4 x 0.4 cm, có lông măng ở bụng; cựa dạng màng, hình tam giác. Bao phấn đỉnh trắng, hình bán cầu, thót lại ở phía trước, rộng 4 - 5 mm; khối phấn hình

trứng, thót lại vào trong cuống ngắn, hơi không cân bằng về kích thước. Nở hoa vào tháng 1 - 2.

Đặc điểm phân bố và sinh thái: Loài Hạc đính bảo lộc này được phát hiện lần đầu vào năm 2012. Cây được thu ở Bảo Lộc và được trồng ở vườn lan của người dân Di Linh, tỉnh Lâm Đồng.

Hiện trạng và giá trị sử dụng: Loài này mới chỉ phát hiện ở Bảo Lộc, hiện tại không còn gặp ngoài tự nhiên. Hạc đính bảo lộc được xếp vào hạng CR (Cực kỳ nguy cấp) trong Sách đỏ của IUCN. Loài này cho hoa đẹp, màu sắc rực rỡ nên bị khai thác gần như cạn kiệt ngoài tự nhiên, vì vậy, cần nghiên cứu các biện pháp nhân giống nhằm bảo tồn nguồn gen loài này trong tương lai.

Hình 3.7. Hạc đính bảo lộc - *Phaius baolocensis* V. D. Nong, T. Chen & X. D. Zhang.

3.1.4.5. Phaius tankervilleae (Banks) Blume. Mus. Bot. 2: 177 1856

Đồng nghĩa: Bletia tankervilleae (Banks) R.Br.; *Calanthe bachmaensis* Gagnep.; *Dendrobium veratrifolium* Roxb.; *Phaius blumei* Lindl.; *Phaius blumei* var. *assamica* Rchb.f.; *Phaius grandifolius* Lour.; *Phaius tancarvilleae* var.

superbus (Van Houtte) S.Y. Hu; *Phaius tankervilleae* var. *mariesii* Rchb.f.; *Phaius tankervilleae* var. *pulchra* (King & Pantl.) Karth.

Tên tiếng Việt: Hạc đính nâu.

Đặc điểm hình thái: Lan đất, củ lớn dạng chóp có nhiều bẹ. Thân cao 50 - 60 cm. Lá lớn dài 30 - 50 cm, rộng 5 - 10 cm, có 7 gân, màu lục nhạt, thuôn hình giáo, nhọn ở đính, gốc có cuống. Cụm hoa thẳng, cao 30 - 70 cm. Hoa lớn, dài 10 cm, cánh hoa trắng ở mặt ngoài, nâu ở mặt trong. Cánh môi màu đỏ có vạch vàng, chia 3 thùy, hai thùy bên cuộn lại, thùy giữa có hai vạch dọc.

Đặc điểm sinh thái và phân bố: Loài này mọc rải rác ở hầu hết các vùng trên các sình lầy ở độ cao 700 - 1.500 m. Trên thế giới loài này có ở Lào, Srilanca, Trung Quốc, Nhật Bản, Thái Lan, Malaysia, Indonesia, New Guinea, Australia. Ở Việt Nam loài này phân bố ở Ninh Bình, Huế, Tây Nguyên (Lâm Đồng, Gia Lai, Kon Tum, Đắk Lắk), Đồng Nai.

Hiện trạng và giá trị sử dụng: Hạc đính nâu thường nở vào dịp Tết là loài lan có hoa to đẹp được nhiều người ưu chuộng. Hiện nay loài này cũng được người dân sưu tầm trồng cho mục đích thương mại, nếu không có các biện pháp nghiên cứu nhân giống cũng như bảo tồn thì tương lai không xa, chúng ta sẽ mất đi nguồn gen này trong tự nhiên.

Hình 3.8. Hạc đính nâu - *Phaius tankervilleae* (Banks) Blume.

3.2. Kết quả nhân giống 05 loài Lan (*Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis* và *Phaius tankervilleae)*

3.2.1. Nhân giống sinh dưỡng

3.2.1.1. Nhân giống sinh dưỡng Hoàng thảo dẹt và Hoàng thảo trần kim

Đối với 2 loài Hoàng thảo dẹt và Hoàng thảo trần kim thì khi nhân giống bằng phương pháp ươm kie thu được hiệu quả từ một thân già được cắt để ươm thì trung bình mỗi mắt sẽ có 1 chồi nảy lên để phát triển thành cây mới. Do đó, chúng tôi sử dụng phương pháp nhân giống sinh dưỡng bằng cách ươm kie và nghiên cứu ảnh hưởng của IBA đến thời gian nảy chồi của lan. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.1.

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng nảy chồi Hoàng thảo dẹt và Hoàng thảo trần kim.

IBA (mg/l)	Tỷ lệ nảy chồi (%)									
	Hoàng thảo dẹt					Hoàng thảo trần kim				
	1 tháng	2 tháng	3 tháng	4 tháng	5 tháng	1 tháng	2 tháng	3 tháng	4 tháng	5 tháng
0	0	0	5.67	14.33	36.87	0	0	0	5.56	30.09
0.5	**0**	**40.06**	**50.53**	**78.67**	**96.67**	0	10.34	20.56	40.22	50.00
1.0	0	20.11	38.87	50.23	72.33	**0**	**30.11**	**50.00**	**80.78**	**98.34**
1.5	0	5.67	12.23	33.87	58.34	0	5.67	10.22	30.44	40.87

Qua kết quả bảng 3.1 cho thấy, tỷ lệ nảy chồi của cả 2 loài ở các nồng độ IBA khác nhau thì khác nhau. Ở các mẫu không xử lý IBA thời gian mẫu nảy chồi cũng như tỷ lệ nảy chồi thấp hơn so với các mẫu được xử lý với IBA.

Đối với Hoàng thảo dẹt, trong nghiệm thức đầu tiên, mẫu không được xử lý với IBA sau 3 tháng mẫu bắt đầu nảy chồi nhưng tỷ lệ rất thấp chỉ đạt 5.67%, đến tháng thứ 4 tỷ lệ nảy chồi chỉ đạt 14.33% và sau 5 tháng chỉ có 36.87% mẫu nảy chồi. Ba nghiệm thức còn lại sau 2 tháng các mẫu được xử lý với IBA ở các nồng độ 0.5; 1.0; 1.5 mg/l mẫu bắt đầu nảy chồi với tỷ lệ dao động từ 5.67% - 40.06%, tối ưu ở nồng độ xử lý 0.5 mg/l IBA với tỷ lệ nảy chồi đạt 40.06%, sau 3 tháng là 50.23% và sau 4 tháng tỷ lệ nảy chồi là 78.67%, đến tháng thứ 5 tỷ lệ nảy chồi đạt 96.67%. Khi tăng nồng độ xử lý lên 1.0 và 1.5 mg/l IBA thì tỷ lệ nảy chồi giảm. Tại nồng độ xử lý 1.0 mg/l IBA sau 2 tháng 20.11% mẫu nảy chồi, sau 3 tháng tỷ lệ nảy chồi là 38.87% và đạt 50.23% mẫu nảy chồi sau 4 tháng, đến tháng thứ 5 tỷ lệ nảy chồi cũng chỉ đạt 72.33%. Khi tăng nồng độ xử lý IBA lên 1.5 mg/l, tỷ lệ nảy chồi đã giảm hẳn so với 2 nghiệm thức xử lý 0.5 mg/l IBA và 1.0 mg/l IBA. Sau 2 tháng tỷ lệ nảy chồi chỉ đạt 5.67%, 12.23% sau 3 tháng, 33.87% sau 4 tháng và 58.34% sau 5 tháng. Tỷ lệ nảy chồi giảm vậy có thể do nồng độ IBA cao đã là giảm sự kích ứng nảy chồi ở các mắt ngủ.

Hình 3.9. Hoàng thảo dẹt ươm kie nảy chồi.

Đối với Hoàng thảo trần kim, trong nghiệm thức đầu tiên, mẫu không được xử lý với IBA sau 4 tháng mẫu bắt đầu nảy chồi nhưng tỷ lệ rất thấp chỉ đạt 5.56%, đến tháng thứ 5 tỷ lệ nảy chồi chỉ đạt 30.09%. Ba nghiệm thức còn lại các mẫu được xử lý với IBA ở các nồng độ 0.5; 1.0; 1.5 mg/l sau 2 tháng mẫu bắt đầu nảy chồi với tỷ lệ dao động từ 5.56% - 30.09%, tối ưu ở nồng độ xử lý 1.0 mg/l IBA tỷ lệ nảy chồi đạt 30.11%, sau 3 tháng là 50.00% và sau 4 tháng tỷ lệ nảy chồi là 80.78%, đến tháng thứ 5 tỷ lệ nảy chồi đạt 98.34%. Tại nồng độ xử lý 0.5 mg/l IBA sau 3 tháng 20.56% mẫu nảy chồi, sau 4 tháng tỷ lệ nảy chồi là 40.22% và 50.00% mẫu nảy chồi sau 5 tháng. Khi tăng nồng độ xử lý lên 1.5 mg/l IBA tỷ lệ nảy chồi giảm, chỉ đạt 10.22% sau 3 tháng, 30.44% sau 4 tháng và 40.87% sau 5 tháng. Như vậy, các đoạn mẫu đều có khả năng nảy chồi, tuy nhiên thời gian nảy chồi sẽ được rút ngắn khi mẫu được xử lý với IBA, đặc biệt ở nồng độ 1.0 mg/l IBA. Trong phương pháp này sau khi cắt đoạn thân già thì phần cây mẹ còn lại sẽ mọc ra các chồi bên để tạo ra các nhánh khác thay thế. Thời gian cắt ngọn có thể thực hiện vào cuối mùa khô và đầu mùa mưa để tránh sự mất nước nhiều cho cây.

Hình 3.10. Hoàng thảo trần kim ươm kie nảy chồi.

Như vậy, trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng phương pháp ươm kie với mẫu được xử lý ở nồng độ 0.5 mg/l IBA đối với Hoàng thảo dẹt và 1.0 mg/l IBA đối với Hoàng thảo trần kim.

3.2.1.2. Nhân giống sinh dưỡng Lan Hài vàng

Với đặc điểm của Lan Hài vàng chúng tôi tiến hành thí nghiệm tách cây và tách bụi với chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ mẫu nảy chồi theo các tháng để tìm ra phương pháp nhân giống sinh dưỡng thích hợp nhất và đem lại hiệu quả cao. Chúng tôi tách và trồng vào giá thể dớn mút chuẩn bị trước. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.2.

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của phương pháp nhân giống tách bụi và tách cây đến khả năng nảy chồi loài Lan Hài vàng.

Phương pháp nhân giống	Tỷ lệ nảy chồi (%)				
	1 tháng	2 tháng	3 tháng	4 tháng	5 tháng
Tách bụi	0	0	30.78	60.67	90.89
Tách cây	**0**	**20.04**	**40.87**	**70.55**	**100**

Kết quả bảng 3.2 cho thấy ở cả 2 phương pháp nhân giống đều đạt tỷ lệ nảy chồi trên 50.00% sau 4 tháng nhân giống. Ở phương pháp nhân giống bằng tách bụi, sau 3 tháng cây mới bắt đầu nảy chồi với tỷ lệ mẫu nảy chồi là 30.78%. Sau 4 tháng đạt 60.67% mẫu nảy chồi và sau 5 tháng tỷ lệ mẫu nảy chồi là 90.89%. Trong phương pháp tách cây, sau 2 tháng mẫu đã bắt đầu xuất hiện chồi mới với 20.04% mẫu nảy chồi. Sau 4 tháng tỷ lệ nảy chồi là 70.55% và đến tháng thứ 5 thì 100% mẫu đã nảy chồi. Như vậy, mặc dù ở cả hai phương pháp nhân giống mẫu đều nảy chồi và cây sinh trưởng, phát triển tốt nhưng ở phương pháp tách cây, mẫu nảy chồi sớm hơn. Do đó, chúng tôi chọn phương pháp nhân giống sinh dưỡng bằng cách tách cây để tiến hành nhân giống sinh dưỡng loài Lan Hài vàng.

Hình 3.11. Tách cây Lan Hài vàng.

3.2.1.3. Nhân giống sinh dưỡng Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu

Với đặc điểm của lan Hạc đính chúng tôi tiến hành thí nghiệm tách củ và ươm cuống hoa với chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ mẫu nảy chồi theo các tháng để tìm ra phương pháp nhân giống sinh dưỡng thích hợp và đem lại hiệu quả cao nhất. Mỗi chậu 1 - 2 đơn vị. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.3.

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của phương pháp nhân giống ươm cuống hoa và tách củ đến khả năng nảy chồi loài Hạc đính.

Phương pháp nhân giống	Tỷ lệ nảy chồi (%)			
	1 tháng	2 tháng	3 tháng	4 tháng
Ươm cuống hoa	0	20.00	30.67	80.33
Tách củ	10.89	25.78	55.11	100

Kết quả bảng 3.3 cho thấy ở cả 2 phương pháp nhân giống đều đạt tỷ lệ nảy chồi trên 80% sau 4 tháng nhân giống. Ở phương pháp nhân giống bằng ươm cuống hoa sau 2 tháng mới bắt đầu nảy chồi với tỷ lệ 20.00% mẫu nảy chồi. Sau 4 tháng đạt 80.33% mẫu nảy chồi. Trong phương pháp tách củ, tháng đầu mẫu đã bắt đầu sưng mắt ngủ, xuất hiện chồi mới với 10.89% mẫu nảy chồi. Sau 4 tháng tỷ lệ nảy chồi là 100%. Như vậy, mặc dù ở cả hai phương pháp nhân giống mẫu đều nảy chồi và cây sinh trưởng phát triển tốt nhưng ở phương pháp tách củ, mẫu nảy chồi sớm hơn và tổng tỷ lệ nảy chồi sau 4 tháng đã đạt 100%. Do đó, chúng tôi chọn phương pháp nhân giống sinh dưỡng bằng cách tách củ để tiến hành nhân giống sinh dưỡng các loài Hạc đính.

Hình 3.12. Nhân giống bằng cuống hoa cây Hạc đính.

3.2.2. Nhân giống *in vitro*

3.2.2.1. Nghiên cứu phương pháp khử trùng chồi ngủ

Tạo nguồn vật liệu ban đầu là một khâu hết sức quan trọng quyết định sự thành công trong việc nuôi cấy mô. Vật liệu khởi đầu phải được khử trùng để đảm bảo sản phẩm tạo ra khi nuôi cấy là sạch nấm bệnh, khuẩn… Các yếu tố ảnh hưởng đến tỷ lệ sạch và tỷ lệ sống của mẫu là nguồn mẫu, hoá chất khử trùng và thời gian khử trùng. Nếu dung dịch khử trùng không có tính sát trùng cao thì khi vào mẫu tỷ lệ bị nhiễm cao. Còn nếu thời gian khử trùng quá ít thì mẫu sẽ không sạch, còn thời gian quá dài thì mẫu sẽ bị tổn thương và chết. Phương pháp nhân giống *in vitro* sử dụng chồi cây làm vật liệu khởi đầu có ưu điểm là cây con vẫn giữ được đặc tính di truyền của cây mẹ, hệ số nhân giống cao hơn so với các phương pháp nhân giống vô tính truyền thống. Tuy nhiên, do chồi được lấy ngoài tự nhiên nên cần phải khử trùng để đảm bảo cho mẫu đưa vào sạch và có khả năng phát sinh hình thái.

Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành thí nghiệm nghiên cứu chế độ khử trùng đối với chồi ngủ. Kết quả thu được thể hiện ở bảng 3.4.

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của phương pháp khử trùng đến khả năng sống, vô trùng của chồi lan (sau 8 tuần).

Chỉ tiêu / NT	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sống, vô trùng (%)
H_2O_2 2% 5 phút + 2 phút	40.00	26.67	33.33
$HgCl_2$ 1‰ 3 phút + 1 phút	20.00	26.67	53.33
Streptomycine 2‰ 5 phút + $HgCl_2$ 1‰ (vài giọt Tween 80) 8 phút	4.13	5.00	90.87

Các công thức khử trùng trên đã được bố trí theo cấp độ tăng dần tác động của hóa chất vào mẫu cấy. Trong các nghiệm thức thí nghiệm, nghiệm thức sử dụng Streptomycine 2‰ 5 phút + $HgCl_2$ 1‰ (vài giọt Tween 80) 8 phút cho tỷ lệ mẫu sống cao nhất đạt 90.87% (Bảng 3.4 và Hình 3.13). Tổng tỷ lệ mẫu nhiễm và chết là 9.13%.

Như vậy nghiệm thức này được chọn để tiếp tục khử trùng các mẫu tiếp theo. Mẫu sau khi khử trùng được cấy trên môi trường ½MS có bổ sung 0.1 mg/l NAA; 1.0 mg/l BA nhằm tạo nguồn mẫu trong nuôi cấy *in vitro.*

Khi đã tạo được nguồn mẫu trong nuôi cấy *in vitro*, chúng tôi tiếp tục bố trí các thí nghiệm tiếp theo.

Hình 3.13. Vào mẫu chồi Hoàng thảo trần kim.

3.2.2.2. Ảnh hưởng của tuổi quả đến khả năng nảy mầm in vitro của hạt Lan Hài vàng trên môi trường MS

Chúng tôi tiến hành gieo hạt lan trên nền môi trường MS bổ sung thêm 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 1 g/l than hoạt tính. Kết quả thu được thể hiện ở bảng 3.5.

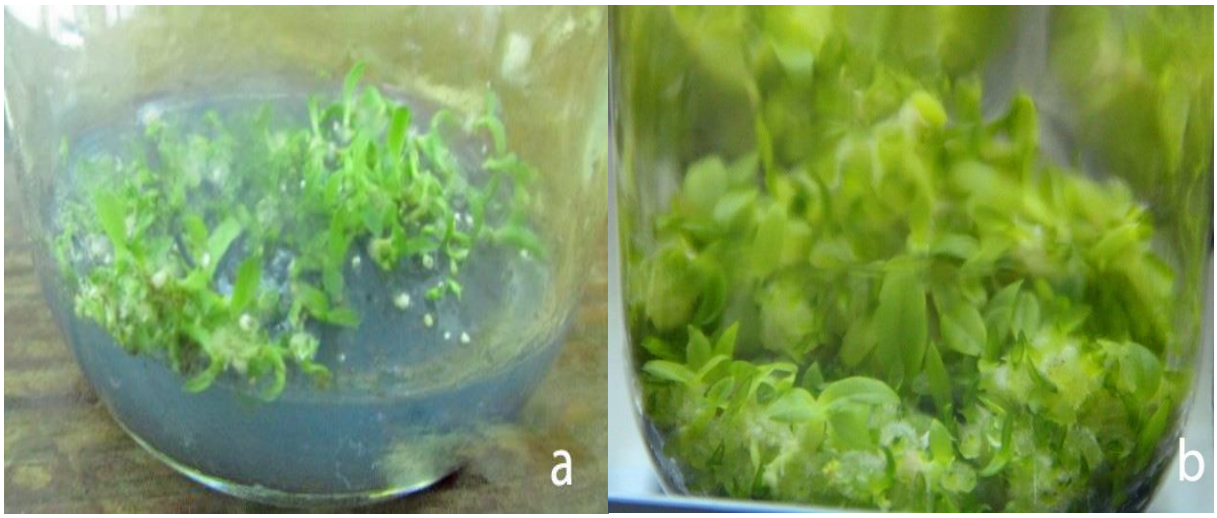
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của tuổi quả đến tỷ lệ nảy mầm của hạt Lan Hài vàng trên môi trường MS.

Tuổi quả	Tỷ lệ hạt nảy mầm (%)		
	1 tháng	2 tháng	3 tháng
5 - 6 tháng	0.00^{d}	0.00^{d}	10.67^{d*}
6 - 7 tháng	14.67^{c}	31.33^{c}	50.00^{c}
7 - 8 tháng	62.00^{a}	86.00^{a}	96.00^{a}
Trên 8 tháng	48.00^{b}	58.00^{b}	76.67^{b}

*Ghi chú: *: Những chữ cái khác nhau (a, b, c…) trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Kết quả bảng 3.5 cho thấy tuổi quả có ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ nảy mầm của hạt Lan Hài vàng. Khi hạt mới nảy mầm hình thành nên protocorms hình cầu màu trắng. Đối với quả lan được 5 - 6 tháng tuổi sau 3 tháng gieo hạt lan mới bắt đầu nảy mầm và tỷ lệ nảy mầm chỉ đạt 10.67%. Trong khi đó, quả lan 6 - 7 tháng sau 1 tháng gieo hạt lan đã bắt đầu nảy mầm với tỷ lệ nảy mầm 14.67%, sau 2 tháng đạt 31.33% và sau 3 tháng tỷ lệ nảy mầm là 50.00%. Tỷ lệ nảy mầm sớm và cao nhất là ở quả lan 7 - 8 tháng, sau 1 tháng gieo hạt tỷ lệ nảy mầm đã đạt 62.00%, sau 2 tháng là 86.00% và sau 3 tháng thì tỷ lệ nảy mầm đã đạt 96.00%. Ở thí nghiệm với quả lan trên 8 tháng thì tỷ lệ nhiễm cao do quả lan đã bung hạt, hạt bị ảnh hưởng nhiều do tiếp xúc trực tiếp với các chất khử trùng mẫu nên tỷ lệ nảy mầm của hạt sau 3 tháng chỉ đạt 76.67%. Shu và cs. (2004) khi nghiên cứu gieo hạt trên cây lan dược liệu *Dendrobium tosaense* kết quả môi trường gieo hạt trên nền MS + 3% saccharose, không có chất điều tiết sinh trưởng là thích hợp. Theo Bo và cs. (2010) hạt lan *P. villosum* var. *densissimun* 200 ngày tuổi được gieo hạt trên môi trường KC sau 80 ngày thì hạt bắt đầu nảy mầm với tỷ lệ nảy mầm 56.00%. Tuổi quả cũng như môi trường gieo hạt mỗi loài khác nhau thì khác nhau.

Như vậy quả lan 7 - 8 tháng tuổi là thích hợp gieo hạt trên môi trường MS với tỷ lệ nảy mầm là 96.00%.



Hình 3.14. Lan Hài vàng nảy mầm sau khi gieo hạt 90 ngày (a), 120 ngày (b).

3.2.2.3. Ảnh hưởng của tuổi quả đến khả năng nảy mầm in vitro của hạt Lan Hài vàng trên nền môi trường ½MS

Sau khi thực hiện thí nghiệm trên chúng tôi tiếp tục tiến hành thí nghiệm ảnh hưởng của tuổi quả đến khả năng nảy mầm của hạt lan trên nền môi trường ½MS bổ sung thêm 30 g/l sucrose, 8 g/l agar và 1 g/l than hoạt tính. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.6.

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của tuổi quả đến tỷ lệ nảy mầm của hạt Lan Hài vàng trên nền môi trường ½MS.

Tuổi quả	Tỷ lệ hạt nảy mầm (%)		
	1 tháng	2 tháng	3 tháng
5 - 6 tháng	0.00^{d}	0.00^{d}	10.00^{d*}
6 - 7 tháng	14.00^{c}	34.00^{c}	45.33^{c}
7 - 8 tháng	61.33^{a}	85.33^{a}	94.00^{a}
Trên 8 tháng	49.33^{b}	55.33^{b}	75.33^{b}

*Ghi chú: *: Những chữ cái khác nhau (a, b, c…) trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Hạt lan khi nuôi cấy ở trạng thái chưa phân hóa và không có chất dự trữ là tinh bột. Điều này cũng phù hợp với giả thuyết: hạt lan có phôi mầm mà không có phôi nhũ, nơi chứa chất dự trữ cần thiết cho sự nảy mầm của hạt. Sự thiếu vắng nội nhũ là một trong những tác nhân khiến hạt lan rất khó nảy mầm nếu như không có nấm mycorrhizal ký sinh hoặc không được nuôi trong môi trường thích hợp (Stimart và cs., 1981). Kết quả bảng 3.6 cho thấy hạt lan ở độ tuổi khác nhau trên nền môi trường ½MS có tỷ lệ nảy mầm tương đương với tỷ lệ nảy mầm của hạt trên nền môi trường MS. Đối với quả lan 5 - 6 tháng tuổi, tháng thứ 3 hạt lan mới bắt đầu nảy mầm với tỷ lệ nảy mầm chỉ đạt 10.00%. Ba nghiệm thức còn lại đều nảy mầm sau 1 tháng, trong đó quả lan 7 - 8 tháng đạt tỷ lệ nảy mầm cao nhất 61.33%, tiền phôi màu trắng, hình cầu xuất hiện. Sau 2 tháng tỷ lệ nảy mầm của quả lan 7 - 8 tháng là 85.33%, quả lan trên 8 tháng có tỷ lệ nảy mầm là 55.33%, thấp nhất là quả lan 6 - 7 tháng tỷ lệ nảy mầm chỉ đạt 34.00%. Đến tháng thứ 3 tỷ lệ nảy mầm của quả lan 7 - 8 tháng là cao nhất đạt 94.00%.

Sau giai đoạn phôi hình cầu thì sự tăng trưởng của protocorms và khả năng tạo cây con khá dễ dàng trên các môi trường nuôi cấy. Sau đó trên các môi trường đều có sự xuất hiện khối mô màu trắng, lú ra khỏi vỏ gọi là protocorms. Protocorms là thuật ngữ được sử dụng để chỉ các cấu trúc chuyển tiếp giữa sự nảy mầm và cây con, có hình cầu hay hình trứng, với một số lông hấp thu đơn bào ở phần gốc và một mô phân sinh ngọn ở đỉnh (Lee và cs., 2012). Protocorms của phần lớn lan biểu sinh nhiệt đới có khả năng phát triển thành chồi trực tiếp, và lớp tiền bì (protoderm) xuất hiện sớm trong sự biệt hoá phôi (Chang và cs., 2005; Lee và cs., 2006; Lee và cs., 2012).

3.2.2.4. Ảnh hưởng của tuổi quả đến khả năng nảy mầm in vitro của hạt Lan Hài vàng trên nền môi trường VW (Vacin & Went)

Sau khi thực hiện thí nghiệm trên môi trường MS và ½MS, chúng tôi tiếp tục tiến hành thí nghiệm khả năng nảy mầm của hạt lan ở các độ tuổi quả khác trên nền môi trường VW bổ sung thêm 30 g/l sucrose, 8.0 g/l agar và 1.0 g/l than hoạt tính. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.7.

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của tuổi quả đến tỷ lệ nảy mầm của hạt Lan Hài vàng trên nền môi trường VW.

Tuổi quả	Tỷ lệ hạt nảy mầm (%)		
	1 tháng	2 tháng	3 tháng
5 - 6 tháng	0.00^{d}	0.00^{d}	4.00^{d*}
6 - 7 tháng	12.67^{c}	26.00^{c}	43.33^{c}
7 - 8 tháng	49.33^{a}	70.67^{a}	80.67^{a}
Trên 8 tháng	43.33^{b}	54.67^{b}	71.33^{b}

*Ghi chú: *: Những chữ cái khác nhau (a, b, c…) trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Kết quả bảng 3.7 cho thấy trên nền môi trường VW tỷ lệ nảy mầm thấp hơn so với trên nền môi trường MS và ½MS. Đối với quả lan 5 - 6 tháng tuổi, sau 3 tháng gieo hạt bắt đầu nảy mầm nhưng tỷ lệ nảy mầm chỉ đạt 4.00%, 3 nghiệm thức còn lại sau 1 tháng gieo hạt nảy mầm nhưng tỷ lệ nảy mầm đều dưới 50.00%. Ở nghiệm thức quả lan 6 - 7 tháng tuổi, sau 3 tháng gieo tỷ lệ nảy mầm của hạt chỉ đạt 43.33%. Đối với nghiệm thức quả lan 7 - 8 tháng và trên 8 tháng tuổi sau 2 tháng gieo tỷ lệ nảy mầm lần lượt là 70.67% và 54.67%, sau 3 tháng tỷ lệ nảy mầm lần lượt là 80.67% và 71.33%. Như vậy, có thể thấy trên 3 nền môi trường MS, ½MS và VW quả lan 7 - 8 tháng tuổi tỷ lệ nảy mầm cao nhất so với các quả lan 5 - 6 tháng tuổi, 6 - 7 tháng và trên 8 tháng tuổi.

Qua 3 thí nghiệm gieo hạt nhận thấy khi gieo trên nền môi trường MS và ½MS cho tỷ lệ gần như nhau nhưng xét về hiệu quả và tiết kiệm kinh phí thì môi trường ½MS được chọn là môi trường gieo hạt Lan Hài vàng.

3.2.2.5. Một số yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của Hoàng thảo trần kim trong nuôi cấy in vitro

a. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng hình thành PLB

- *Ảnh hưởng của BA đến khả năng hình thành PLB*

BA là chất điều hòa sinh trưởng nhân tạo thuộc nhóm cytokinin, là nhóm được sử dụng rộng rãi nhất trong kỹ thuật nuôi cấy mô hiện nay. Tác dụng chủ yếu của BA là kích thích sự phân chia tế bào.

Sau khi tiến hành vào mẫu chồi 30 ngày, chọn những mẫu sạch nấm bệnh chuyển vào môi trường MS có bổ sung BA với các nồng độ khác nhau để tiến hành thí nghiệm. Kết quả thu được thể hiện ở bảng 3.8.

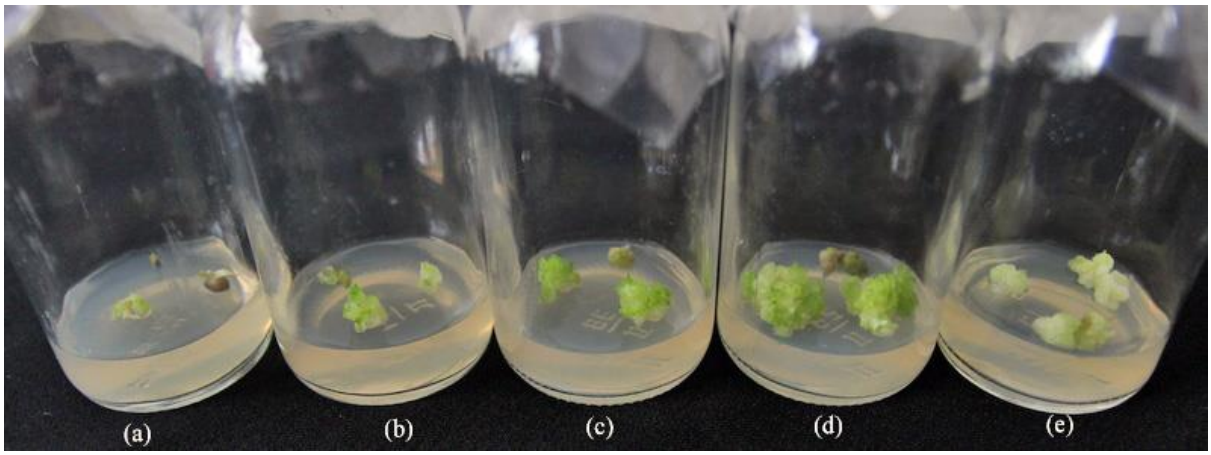
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của BA đến khả năng hình thành PLB Hoàng thảo trần kim.

BA (mg/l)	Số PLB/mẫu	Tỷ lệ tạo PLB (%)
0	2.75^{d*}	29.84
1.0	4.0^{c}	44.46
1.5	5.4^{b}	51.36
2.0	**6.67^{a}**	**68.68**
2.5	4.86^{b}	60.55

*Ghi chú: *: Những chữ cái khác nhau (a, b, c…) trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Kết quả bảng 3.8 cho thấy sau 45 ngày nuôi cấy, môi trường bổ sung chất kích thích sinh trưởng cho số PLB/mẫu cấy cao hơn môi trường không bổ sung chất kích thích sinh trưởng. Trong thí nghiệm này thì BA có ảnh hưởng tốt tới khả năng cảm ứng tạo và nhân nhanh PLB của loài Hoàng thảo trần kim. Trên môi trường bổ sung 2.0 mg/l BA cho kết quả tối ưu, tỷ lệ mẫu tạo PLB đạt 68.68% với số PLB/mẫu cấy là 6.67 (Hình 3.15d). Khi tiếp tục tăng nồng độ BA lên 2.5 mg/l thì số PLB/mẫu giảm chỉ đạt 4.86, điều này có thể là do nồng độ BA cao đã gây ức chế khả năng hình thành PLB. Như vậy, trong thí nghiệm này khả năng tạo PLB phụ thuộc vào nồng độ BA có trong môi trường. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu nhân giống loài *D. chrysotoxum* của Nguyễn Văn Song (2013). Tuy nhiên, Luo và cs. (2008) cho rằng môi trường tối ưu cho quá trình cảm ứng PLB là môi trường bổ sung 5.0 mg/l BA khi nuôi cấy *D. densiflorum*. Sự khác biệt này có thể là do sự khác nhau về đối tượng nghiên cứu.

Vậy, môi trường nuôi cấy MS bổ sung 2.0 mg/l BA là môi trường tối ưu tạo PLB đối với loài Hoàng thảo trần kim ở thí nghiệm này.



Hình 3.15. Ảnh hưởng của BA đến khả năng hình thành PLB Hoàng thảo trần kim ở các nồng độ BA lần lượt 0; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 mg/l.

- Ảnh hưởng của BA kết hợp NAA đến khả năng hình thành PLB

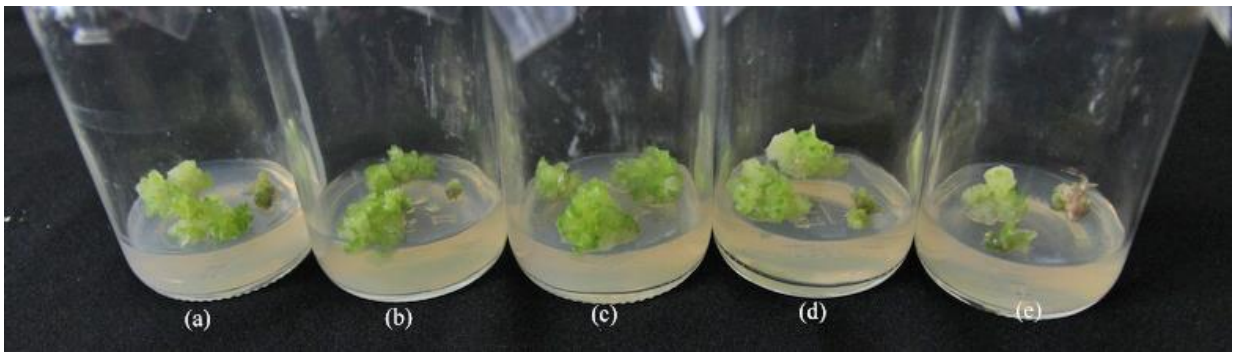
Sau khi tiến hành thí nghiệm trên, chúng tôi tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của BA (2.0 mg/l) kết hợp NAA (0.2; 0.5; 1.0; 1.5 mg/l) lên khả năng hình thành PLB. Kết quả sau 45 ngày nuôi cấy được thể hiện ở bảng 3.9.

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của BA kết hợp NAA đến khả năng hình thành PLB Hoàng thảo trần kim.

BA (mg/l)	NAA (mg/l)	Số PLB/mẫu	Tỷ lệ tạo PLB (%)
2.0	0	6.67^{c*}	68.68
2.0	0.2	8.90^{b}	70.60
2.0	**0.5**	**10.24^{a}**	**90.11**
2.0	1.0	7.64^{c}	70.73
2.0	1.5	6.79^{c}	48.06

*Ghi chú: *: Những chữ cái khác nhau (a, b, c…) trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Kết quả bảng 3.9 cho thấy sau 45 ngày nuôi cấy có sự ảnh hưởng khác biệt giữa các yếu tố môi trường lên khả năng tạo PLB. Tại nồng độ BA 2.0 mg/l kết hợp 0.2 mg/l NAA cho số PLB/mẫu là 8.90 và 70.60% mẫu tạo PLB (Hình 3.16b). Đặc biệt khi tăng nồng độ lên 0.5 mg/l NAA kết hợp 2.0 mg/l BA kết quả cho số PLB hình thành cao nhất đạt 10.24 PLB/mẫu với tỷ lệ tạo PLB là 90.11% (Hình 3.16c). Tuy nhiên khi nồng độ NAA lên 1.5 mg/l kết hợp 2.0 mg/l BA thì số PLB/mẫu và tỷ lệ tạo PLB giảm thấp nhất chỉ đạt 6.79 PLB/mẫu với tỷ lệ tạo PLB là 48.06% (Hình 3.16e). Như vậy, khả năng tạo PLB phụ thuộc vào nồng độ tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng bổ sung vào môi trường nuôi cấy, sự kết hợp về tỷ lệ nồng độ giữa chúng thường rất quan trọng (Hossain và cs., 2010). Sunitibala và Kishor (2009) đã nghiên cứu nhân giống *D. transparens* và chứng minh BA kết hợp với NAA tốt hơn BA kết hợp với IBA và IAA. Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Hossain (2013).



Hình 3.16. Ảnh hưởng của BA và NAA đến khả năng hình thành PLB Hoàng thảo trần kim. (a) ĐC; (b) 2.0 mg/l BA + 0.2 mg/l NAA; (c) 2.0 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA; (d) 2.0 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA; (e) 2.0 mg/l BA + 1.5 mg/l NAA.

Vậy, môi trường nuôi cấy MS bổ sung 0.5 mg/l NAA kết hợp 2.0 mg/l BA là môi trường tối ưu tạo PLB đối với loài Hoàng thảo trần kim ở thí nghiệm này.

- Ảnh hưởng của TDZ kết hợp NAA đến khả năng hình thành PLB

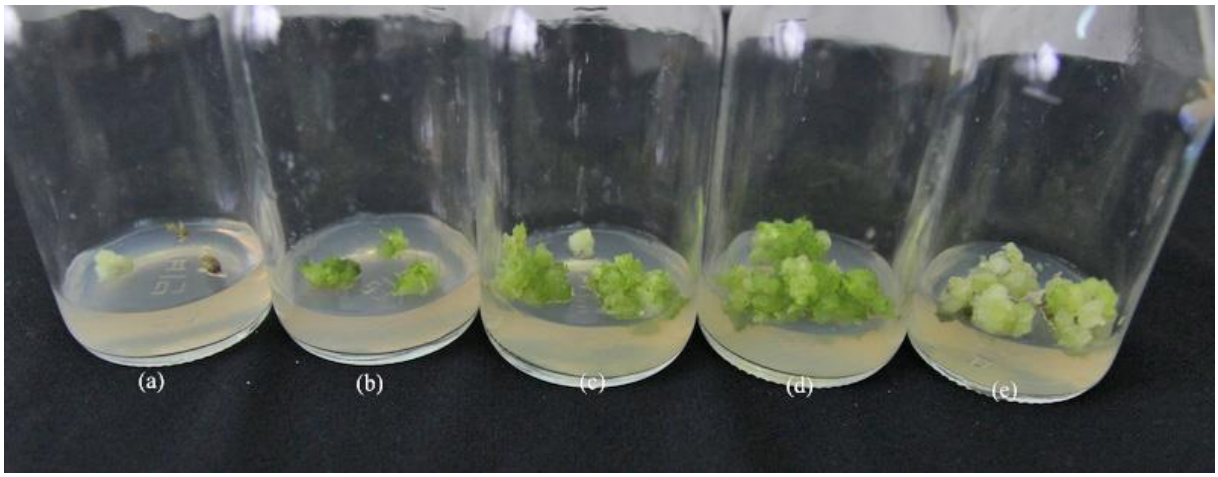
Chúng tôi tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của TDZ lên sự hình thành PLB loài Hoàng thảo trần kim. Khả năng hình thành PLB sau 45 ngày nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung TDZ (0.5; 1.0; 1.5; 2.0 mg/l) kết hợp NAA (0.5 mg/l) được thể hiện ở bảng 3.10.

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của TDZ kết hợp NAA đến khả năng hình thành PLB Hoàng thảo trần kim.

TDZ (mg/l)	NAA (mg/l)	Số PLB/mẫu	Tỷ lệ tạo PLB (%)
0	0	2.75^{e*}	29.84
0.5	0.5	8.55^{d}	60.89
1.0	0.5	10.86^{c}	72.11
1.5	**0.5**	**14.11^{a}**	**92.06**
2.0	0.5	13.20^{b}	89.46

*Ghi chú: *: Những chữ cái khác nhau (a, b, c…) trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Qua bảng 3.10 cho thấy, ở môi trường đối chứng cho số PLB thấp nhất 2.75 PLB/mẫu và 29.84% mẫu tạo PLB. Trong khi đó ở các môi trường nuôi cấy khi bổ sung TDZ kết hợp với NAA thì khả năng tạo PLB hiệu quả hơn với số PLB và tỷ lệ mẫu tạo PLB tăng. Khi sử dụng môi trường nuôi cấy bổ sung TDZ kết hợp NAA ở các nồng độ khác nhau số PLB/mẫu cấy dao động trong khoảng từ 8.55 PLB/mẫu đến 14.11 PLB/mẫu và tỷ lệ mẫu tạo PLB đạt trong khoảng từ 60.89% đến 92.06% (Hình 3.17). Trong đó, môi trường nuôi cấy bổ sung 1.5 mg/l TDZ kết hợp 0.5 mg/l NAA là môi trường tối ưu cho số PLB/mẫu cấy cao nhất (14.11 PLB/mẫu) và tỷ lệ mẫu tạo PLB cũng cao nhất (92.06%), PLB thu được hình cầu màu xanh vàng (Hình 3.17d). Tuy nhiên, nếu nồng độ TDZ tăng thì số PLB trên mẫu và tỷ lệ tạo PLB lại giảm đi, đặc biệt khi nồng độ TDZ tăng lên 2.0 mg/l kết hợp 0.5 mg/l NAA thì PLB bị mọng nước, màu trắng vàng rồi chết dần (Hình 3.17e). TDZ là một chất hoá học tổng hợp thuộc nhóm cytokinin, có tác dụng kích thích sự phân chia tế bào và hình thành chồi. Nó được sử dụng như chất điều hoà sinh trưởng thực vật nhân tạo trong nuôi cấy *in vitro* (Murthy và Mohanty, 1995). Nồng độ của TDZ được sử dụng trong nhân giống *in vitro* ở những loài cây khác nhau là khác nhau. Hiện nay, TDZ được ứng dụng rộng rãi trong nuôi cấy mô tế bào thực vật trên nhiều đối tượng cây trồng, tuy nhiên các nghiên cứu sử dụng TDZ trong việc nhân giống *in vitro* cây hoa lan còn ít. Kha Nữ Tú Uyên và cs. (2015) đã sử dụng TDZ và NAA trong nhân giống lan *Renanthera* sp. cho kết quả bổ sung 1.0 mg/l TDZ là thích hợp với 51.00% mẫu phát sinh PLB.



Hình 3.17. Ảnh hưởng của TDZ kết hợp NAA đến khả năng hình thành PLB Hoàng thảo trần kim. (a) ĐC; (b) 0.5 mg/l TDZ + 0.5 mg/l NAA; (c) 1.0 mg/l TDZ + 0.5 mg/l NAA; (d) 1.5 mg/l TDZ + 0.5 mg/l NAA; (e) 2.0 mg/l TDZ + 0.5 mg/l NAA.

Vậy môi trường MS bổ sung 2.0 mg/l BA kết hợp 0.5 mg/l NAA hoặc môi trường MS bổ sung 1.5 mg/l TDZ kết hợp 0.5 mg/l NAA có thể được chọn làm môi trường tạo PLB của Hoàng thảo trần kim.

b. Nghiên cứu tái sinh chồi in vitro

- Ảnh hưởng của nồng độ nước dừa đến sự hình thành và phát triển của chồi cây in vitro

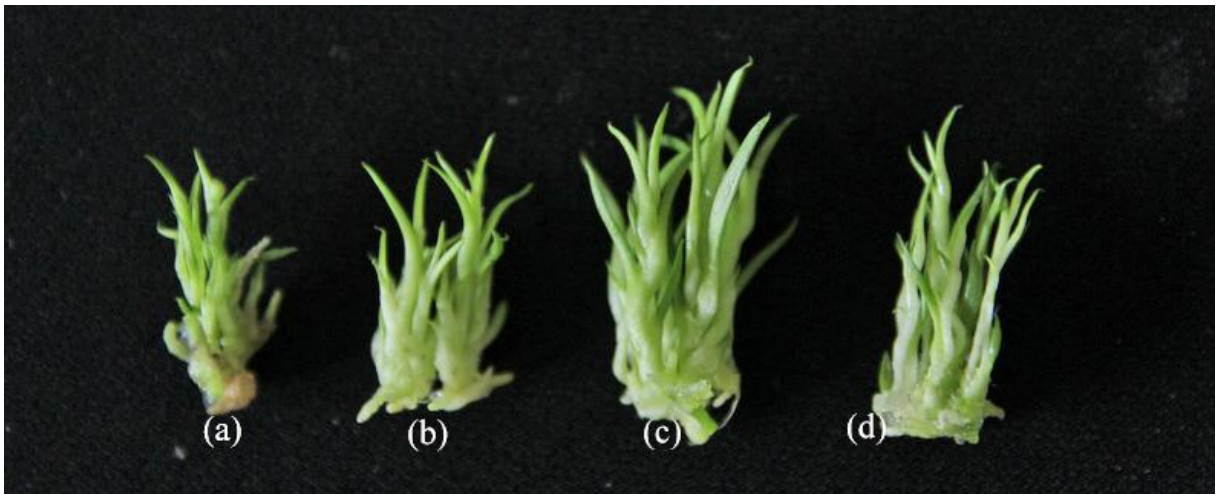
Nước dừa là một sản phẩm tự nhiên giàu các cytokinin. Theo Tokuhara và Mii (1993) đối với các loài lan nước dừa cũng cho thấy tác dụng tích cực của chúng. Hiện nay nước dừa được dùng rộng rãi trong lĩnh vực nuôi cấy mô và nhân giống *in vitro* hoa lan (Arditti, 2009). Để biết được nồng độ nước dừa như thế nào là cần thiết và có hiệu quả cho giai đoạn hình thành và phát triển chồi cây *in vitro* Hoàng thảo trần kim, chúng tôi tiến hành thí nghiệm bổ sung nước dừa ở các nồng độ khác nhau (10, 15, 20%) vào môi trường nuôi cấy MS, kết quả theo dõi sau 60 ngày được thể hiện ở bảng 3.11.

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của nồng độ nước dừa đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro* Hoàng thảo trần kim.

Nồng độ nước dừa (%)	Số chồi trung bình/cụm	Chiều cao chồi (cm)
0	4.17^{d}	0.62^{c*}
10	5.60^{c}	1.53^{b}
15	$\mathbf{8.42^{a}}$	$\mathbf{1.68^{ab}}$
20	6.64^{b}	1.71^{a}

*Ghi chú: *: Những chữ cái khác nhau (a, b, c…) trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Kết quả bảng 3.11 cho thấy, nước dừa có ảnh hưởng khá tích cực đến sự hình thành và phát triển chồi *in vitro* của Hoàng thảo trần kim. Khi bổ sung nước dừa vào môi trường thì khả năng hình thành chồi cũng lần lượt tăng lên. Ở nghiệm thức bổ sung 15% nước dừa có số chồi trung bình/cụm cao nhất đạt 8.42 chồi/cụm với chiều cao chồi 1.68 cm (Hình 3.18c). Tuy nhiên, khi tăng nồng độ lên 20% thì số chồi trung bình/cụm giảm xuống còn 6.64 chồi/cụm và chiều cao chồi chỉ đạt 1.71 cm. Trong nước dừa non giàu clorua, kali, magie, vitamin A, E, đồng thời chứa một lượng muối, đường, protein phù hợp cho sự hình thành và sinh trưởng chồi cây. Kết quả này của chúng tôi phù hợp với kết quả của Vijayakumar và cs. (2012) khi nghiên cứu nhân giống *in vitro* lan *Dendrobium* sp.. Phan Xuân Huyên và cs. (2015) khi nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây hoa *Miltonia* sp. cũng cho kết quả bổ sung 15% nước dừa vào môi trường nuôi cấy là thích hợp để nhân nhanh chồi.



Hình 3.18. Ảnh hưởng của nồng độ nước dừa đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro* Hoàng thảo trần kim. (a) ĐC; (b) 10% nước dừa; (c) 15% nước dừa; (d) 20% nước dừa.

Như vậy, bổ sung 15% nước dừa vào môi trường nuôi cấy là nồng độ thích hợp để nhân nhanh cụm chồi lan Hoàng thảo trần kim. Nồng độ này sẽ được chúng tôi sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo.

- Ảnh hưởng của BA đến sự hình thành và phát triển của chồi cây in vitro

Việc xác định được nồng độ chất kích thích sinh trưởng tối ưu bổ sung vào môi trường nuôi cấy để hình thành và phát triển chồi, đồng thời các chồi đều đạt chất lượng tốt không bị biến dị trước khi chuyển sang môi trường tạo cây hoàn chỉnh là một yêu cầu không thể thiếu trong nhân giống *in vitro*.

Theo nhiều nghiên cứu cho thấy, BA thường được sử dụng với nồng độ thay đổi từ 1.0 - 3.0 mg/l là thích hợp cho nhiều loại mô cấy. Ở các nồng độ cao hơn hoặc thấp hơn đều biểu hiện hiệu quả kích thích kém, dẫn đến sự tạo chồi và sinh trưởng của chồi giảm. Với nồng độ BA cao sẽ hoạt hóa sự hình thành chồi bất định (Comb (1978), Zimmerman và Broome (1981)). Dựa trên nghiên cứu của

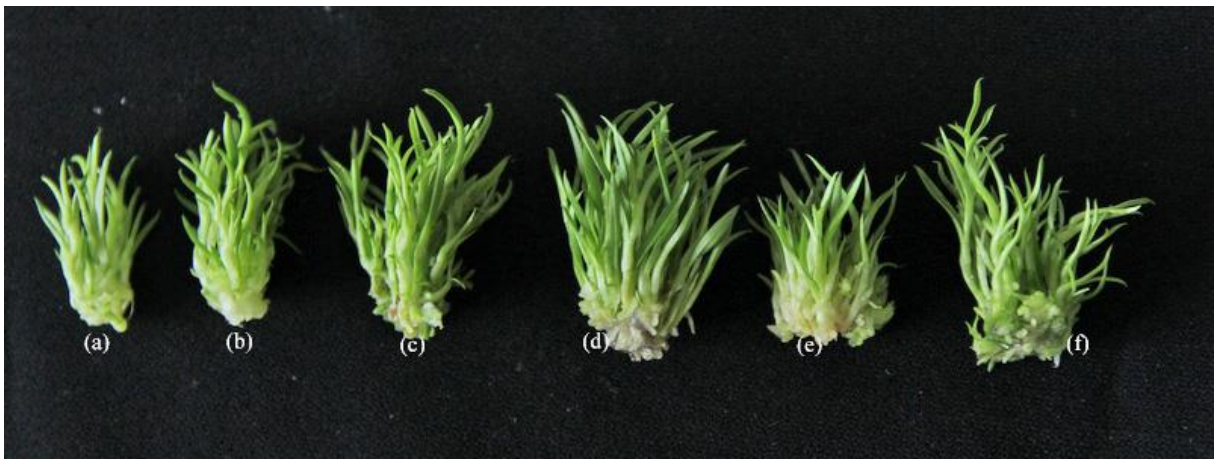
một số tác giả trên đối tượng lan *Dendrobium*, chúng tôi tiến hành bổ sung BA ở các nồng độ (0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 mg/l) vào môi trường nuôi cấy MS để tìm ra nồng độ BA thích hợp cho sự hình thành và phát triển chồi Hoàng thảo trần kim. Sau 60 ngày nuôi cấy, khả năng hình thành và phát triển chồi của Hoàng thảo trần kim được thể hiện ở bảng 3.12.

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của hàm lượng BA đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro* Hoàng thảo trần kim.

BA (mg/l)	Số chồi/cụm	Chiều cao chồi (cm)
0	8.42^{d}	1.68^{d*}
0.5	15.33^{c}	1.77^{c}
1.0	19.04^{b}	1.87^{b}
1.5	**22.35^{a}**	**1.96^{a}**
2.0	20.02^{b}	1.75^{cd}
2.5	19.29^{b}	1.71^{cd}

*Ghi chú: *: Những chữ cái khác nhau (a,b,c…) trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Kết quả bảng 3.12 cho thấy, sự hình thành và sinh trưởng chồi cây tăng lên khi bổ sung nồng độ BA từ 0 đến 2.0 mg/l vào môi trường nuôi cấy, số chồi/cụm tăng từ 8.42 đến 22.35; chiều cao chồi tăng từ 1.68 cm đến 1.96 cm (Hình 3.19). Tối ưu trên môi trường bổ sung 1.5 mg/l BA, chiều cao chồi đạt 1.96 cm với 22.35 chồi/mẫu (Hình 3.19d). Khi nồng độ BA tăng lên 2.5 mg/l thì sự hình thành và sinh trưởng của chồi cây giảm xuống, chiều cao chồi xuống còn 1.71 cm với 19.29 chồi/mẫu (Hình 3.19f). Điều này cho thấy, nồng độ BA từ 0 - 2.0 mg/l có tác dụng thúc đẩy các protocorms phát triển thành chồi cây, nhưng khi nồng độ BA tăng lên 2.5 mg/l sẽ có tác dụng kìm hãm sự hình thành chồi, chồi phát triển không đồng đều.



Hình 3.19. Ảnh hưởng của BA đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro* Hoàng thảo trần kim lần lượt ở các nồng độ 0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 mg/l.

BA là chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin có vai trò quan trọng trong phân chia tế bào và kích thích sự hình thành chồi. Bởi vậy, trong nuôi cấy mô tế bào thực vật BA thường được sử dụng trong giai đoạn nhân nhanh. BA đã được sử dụng nghiên cứu nhân giống trên nhiều loại lan Hoàng thảo khác như: *D. aggregatum* (Vijayakumar và cs., 2012); *D. chrysanthum* (Rao và Barman, 2014)... Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết quả của Sana và cs. (2011) khi nghiên cứu nhân giống *in vitro* lan *D. nobile var*. Emma white.

- Ảnh hưởng hàm lượng dịch nghiền củ, quả đến sự hình thành và phát triển của chồi cây in vitro

Môi trường và các thành phần bổ sung là nhân tố quan trọng ảnh hưởng đến sự hình thành, phân hóa mô tế bào và các cơ quan trong nuôi cấy mô. Để thúc đẩy sự sinh trưởng và chất lượng cây người ta cũng thường bổ sung vào môi trường nuôi cấy dịch nghiền hữu cơ như: chuối, khoai tây, cà rốt... Đây là những nguồn hữu cơ thành phần không xác định, khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy sẽ có tác dụng kích thích sự sinh trưởng và phát triển của mô tế bào (Arditti, 2009).

Chúng tôi bổ sung dịch nghiền khoai tây, chuối chín và cà rốt vào môi trường nuôi cấy để nghiên cứu sự hình thành và phát triển chồi Hoàng thảo trần kim. Kết quả sau 60 ngày nuôi cấy được thể hiện trong bảng 3.13.

Bảng 3.13. Ảnh hưởng của dịch nghiền khoai tây, chuối chín, cà rốt đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro* Hoàng thảo trần kim.

Nghiệm thức	Số chồi/cụm	Chiều cao chồi (cm)
Đối chứng	8.42^{d}	1.68^{c*}
60 g khoai tây/l môi trường	22.62^{b}	1.85^{b}
60 g chuối chín/l môi trường	**25.11^{a}**	**2.12^{a}**
60 g cà rốt/l môi trường	20.82^{c}	1.71^{c}

*Ghi chú: *: Những chữ cái khác nhau (a, b, c…) trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Kết quả thu được ở bảng 3.13 cho thấy, đối với môi trường bổ sung dịch nghiền hữu cơ thì sự hình thành và phát triển chồi cây tốt hơn môi trường đối chứng (không bổ sung dịch nghiền). So sánh sự sinh trưởng của chồi ở môi trường có chứa các dịch nghiền ta thấy dịch nghiền chuối có tác động tốt hơn đến sự sinh trưởng, phát triển của chồi cây so với 2 dịch nghiền còn lại. Ở nghiệm thức bổ sung vào môi trường nuôi cấy 60 g chuối chín/l môi trường cho số chồi/cụm và chiều cao chồi cao nhất (25.11 chồi/cụm và 2.12 cm), chồi to khỏe màu xanh đậm (Hình 3.20c). Dịch nghiền khoai tây có chứa cacbonhydrat dưới dạng saccaroza, glucose và fructose, aminoaxit, các muối khoáng (K, Fe, Mg…) và đặc biệt là các vitamin (C, B1, B6) nên thường được bổ sung vào môi trường vi nhân giống hoa lan (Sutter và Langhans, 1979). Dịch nghiền cà rốt khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy làm gia tăng nguồn dinh dưỡng vì chứa hàm lượng cao đường và các

vitamin. Còn dịch nghiền chuối chín chứa các hợp chất quan trọng về mặt sinh lý như serotinin, norepinephrine, dopamin và một số catecholamine chưa xác định. Việc bổ sung dịch nghiền chuối vào môi trường nuôi cấy hoa lan thường kích thích sự sinh trưởng bởi nó có tác dụng ổn định pH của môi trường và chứa hợp chất có hoạt tính cytokinin tự nhiên (Van và Stewart, 1975). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Thị Sơn và cs. (2014) bổ sung 60 g chuối chín/l môi trường khi nhân nhanh cụm chồi lan *D. officinale*. Shu và cs. (2004) đã công bố môi trường nhân nhanh chồi trên cây lan dược liệu *D. tosaense* là môi trường có bổ sung 8% dịch nghiền chuối.

Hình 3.20. Ảnh hưởng của hàm lượng dịch nghiền củ, quả đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro* Hoàng thảo trần kim. (a) ĐC; (b) 60 g khoai tây/l môi trường; (c) 60 g chuối chín/l môi trường; (d) 60 g cà rốt/l môi trường.

Qua kết quả các thí nghiệm tạo chồi, chúng tôi nhận thấy ở môi trường MS bổ sung 60 g chuối chín/l môi trường cho số chồi/cụm cũng như chiều cao chồi (25.11 chồi/cụm; 2.12 cm) cao hơn môi trường bổ sung 1.5 mg/l BA (22.35 chồi/cụm; 1.96 cm). Như vậy, môi trường MS bổ sung 60 g chuối chín/l môi trường được chọn là môi trường nhân nhanh cụm chồi loài Hoàng thảo trần kim.

c. Nghiên cứu quá trình tạo rễ chồi cây in vitro

- Ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng tái sinh rễ in vitro

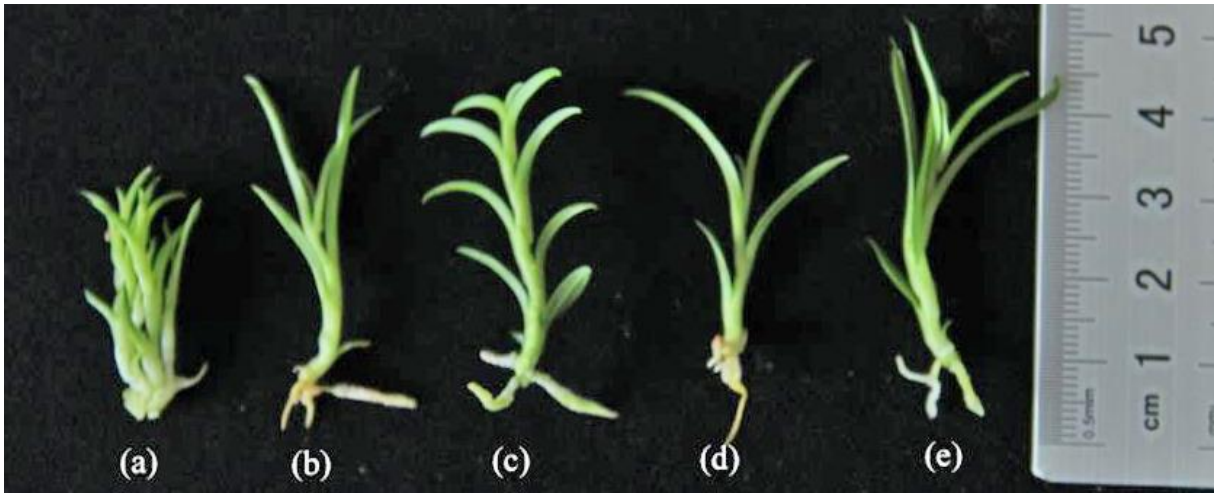
Bổ sung than hoạt tính vào môi trường có tác dụng tạo độ xốp và độ tối cho môi trường rất phù hợp cho quá trình ra rễ của chồi. Thí nghiệm này chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của than hoạt tính ở các nồng độ 0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 g/l để tìm ra nồng độ thích hợp ở giai đoạn tái sinh rễ *in vitro*. Kết quả sau 60 ngày nuôi cấy được thể hiện ở bảng 3.14.

Bảng 3.14. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng tái sinh rễ *in vitro* Hoàng thảo trần kim.

Than hoạt tính (g/l)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)
0	41.20	0.77^{d}	0.44^{e*}
0.5	50.06	1.11^{c}	0.90^{d}
1.0	**50.53**	**2.04^{a}**	**1.88^{a}**
1.5	50.51	1.68^{b}	1.49^{b}
2.0	50.00	1.19^{c}	1.13^{c}

*Ghi chú: *: Những chữ cái khác nhau (a,b,c…) trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Kết quả bảng 3.14 cho thấy, ở tất cả các công thức có bổ sung than hoạt tính đều cho tỷ lệ chồi ra rễ đạt từ 50.00% trở lên. Như vậy, than hoạt tính cũng có ảnh hưởng khá tích cực đến khả năng ra rễ của lan Hoàng thảo trần kim. Môi trường bổ sung 1.0 g/l than hoạt tính cho khả năng ra rễ tối ưu với chiều dài rễ đạt 1.88 cm/rễ, số lượng rễ trung bình là 2.04 rễ/chồi, tỷ lệ ra rễ đạt 50.53%, cây con xanh và rễ to khỏe (Hình 3.21c). Tuy nhiên, khi bổ sung cao hơn 1.0 g/l than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy chúng tôi nhận được kết quả tất cả các chỉ tiêu như tỷ lệ chồi ra rễ, chiều dài rễ và số rễ/chồi đều giảm. Điều này có thể giải thích là do than hoạt tính đã hấp phụ một số chất điều tiết sinh trưởng và dinh dưỡng cần thiết khác khiến cây không sử dụng được nên chậm phát triển. Than hoạt tính đưa vào môi trường giúp ngăn cản quá trình hóa nâu hay đen (do mẫu nuôi cấy có chứa nhiều chất tanin hoặc hydroxyphenol). Đặc biệt môi trường bổ sung dịch chuối nghiền kết hợp với than hoạt tính sẽ giúp cây sinh trưởng tốt hơn (Ernst, 1975).



Hình 3.21. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng tái sinh rễ *in vitro* Hoàng thảo trần kim ở các nồng độ lần lượt 0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 g/l.

- Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng (IAA, IBA, NAA) đến khả năng tái sinh rễ in vitro

Các chồi cây *in vitro* đồng đều về chiều cao được tách riêng rẽ cấy trên môi trường ½MS bổ sung độc lập các chất kích thích sinh trưởng IAA, IBA, NAA lần lượt ở các nồng độ 0.3; 0.5; 1.0 mg/l và 1.0 g/l than hoạt tính, khả năng tái sinh rễ *in vitro* của chồi sau 60 ngày nuôi cấy thể hiện trên bảng 3.15.

Bảng 3.15. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng (IAA, IBA, NAA) đến khả năng tái sinh rễ *in vitro* Hoàng thảo trần kim.

IAA (mg/l)	IBA (mg/l)	NAA (mg/l)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)
0	0	0	50.53	2.04^{f}	1.88^{g*}
0.3	–	–	67.35	2.88^{e}	2.75^{e}
0.5	–	–	71.82	4.35^{d}	2.93^{de}
1.0	–	–	71.06	2.37^{ef}	2.15^{f}
–	0.3	–	72.67	4.44^{d}	2.87^{e}
–	0.5	–	81.15	5.62^{c}	3.22^{c}
–	1.0	–	80.53	3.93^{d}	3.15^{cd}
–	–	0.3	91.82	5.44^{c}	3.82^{ab}
–	–	**0.5**	**98.51**	**7.91^{a}**	**4.01^{a}**
–	–	1.0	93.18	6.46^{b}	3.63^{b}

*Ghi chú: *: Những chữ cái khác nhau (a, b, c…) trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Kết quả bảng 3.15 cho thấy, trong môi trường không bổ sung chất kích thích sinh trưởng (nghiệm thức đối chứng) 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. Khi bổ sung IBA vào môi trường nuôi cấy, nghiệm thức bổ sung 0.5 mg/l IBA cho số rễ cao nhất đạt 5.62 rễ/chồi, chiều dài rễ là 3.22 cm với 81.15% chồi ra rễ, tuy nhiên rễ mảnh, yếu. Các nghiệm thức bổ sung IAA cho tỷ lệ ra rễ, số rễ và chiều dài rễ thấp hơn so với IBA và NAA khi cùng nồng độ. Ở các nghiệm thức bổ sung 0.3; 0.5; 1.0 mg/l NAA cho tỷ lệ ra rễ lần lượt là 91.82%; 98.51%; 93.18%; đặc biệt nghiệm thức bổ sung 0.5 mg/l NAA là tối ưu với tỷ lệ ra rễ 98.51%, số lượng rễ đạt 7.91 rễ/chồi, chiều dài rễ là 4.01 cm, rễ khỏe với nhiều rễ phụ. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Koravisd (2011), môi trường bổ sung NAA thuận lợi nhất cho sự ra rễ của chồi lan *D. chrysanthum* với 4.8 rễ/chồi. Bên cạnh đó, Dake và cs. (2013) cũng sử dụng môi trường ½MS bổ sung 0.5 mg/l NAA tạo rễ *in vitro* cây *D. wangliangii*.

Như vậy, môi trường ½MS có bổ sung 1.0 g/l than hoạt tính và 0.5 mg/l NAA thích hợp cho quá trình tái sinh rễ *in vitro* Hoàng thảo trần kim.

Hình 3.22. Ảnh hưởng của các IAA, IBA, NAA đến khả năng tái sinh rễ *in vitro* của Hoàng thảo trần kim lần lượt ở các nồng độ 0.3; 0.5; 1.0 mg/l.

3.2.2.6. Một số yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của Hoàng thảo dẹt trong nuôi cấy in vitro

a. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng hình thành PLB

- Ảnh hưởng của BA kết hợp NAA đến khả năng hình thành PLB

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. Mô phân sinh ngọn chồi phát triển từ một khối tròn trong suốt sau 1 tuần nuôi cấy, phát triển mô, hình thành PLB sau 30 ngày nuôi cấy đến 45 ngày nuôi cấy tạo PLB hình cầu, màu xanh vàng. Phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng là kỹ thuật vừa tạo ra cây sạch bệnh virus vừa cho tỷ lệ nhân giống cao bởi vì 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 (Morel, 1960). 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. Như vậy, nhân giống lan từ các protocorms xuất phát từ đỉnh sinh trưởng được xem là ổn định về nguồn gen và sạch bệnh.

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 sau 45 ngày nuôi cấy được thể hiện ở bảng 3.16.

Bảng 3.16. Ảnh hưởng của BA và NAA đến quá trình hình thành PLB Hoàng thảo dẹt.

BA (mg/l)	NAA (mg/l)	Số PLB/mẫu	Tỷ lệ tạo PLB (%)
0	0	1.46^{h}	20.00^{h*}
1.0	0.2	2.53^{fg}	42.23^{cde}
1.5	0.2	2.89^{cdef}	51.10^{bc}
2.0	0.2	3.09^{cd}	48.90^{bcd}
2.5	0.2	3.89^{b}	53.50^{b}
1.0	**0.5**	**6.62^{a}**	**86.63^{a}**
1.5	0.5	2.57^{efg}	33.30^{fg}
2.0	0.5	2.71^{defg}	35.53^{efg}
2.5	0.5	2.80^{dfgh}	40.00^{def}
1.0	1.0	2.76^{dfgh}	44.43^{cde}
1.5	1.0	3.20^{c}	48.87^{bcd}
2.0	1.0	2.49^{g}	31.07^{g}
2.5	1.0	2.93^{cde}	44.43^{cde}

*Ghi chú: *: Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Kết quả bảng 3.16 cho thấy có sự ảnh hưởng khác biệt giữa các yếu tố môi trường lên khả năng tạo PLB sau 45 ngày nuôi cấy, đối với môi trường bổ sung chất kích thích sinh trưởng cho số PLB/mẫu cao hơn môi trường không bổ sung chất kích thích sinh trưởng (nghiệm thức đối chứng). Khi sử dụng môi trường nuôi cấy MS kết hợp đồng thời chất điều hòa sinh trưởng BA và NAA ở các nồng độ khác nhau thể hiện trong bảng 3.16 thu được kết quả tương đối tốt, số PLB/mẫu dao động trong khoảng từ 2.49 PLB/mẫu đến 6.62 PLB/mẫu và tỷ lệ mẫu tạo PLB đạt trong khoảng từ 31.07% đến 86.63%. Trên môi trường nuôi cấy bổ sung 1.0 mg/l BA và 0.5 mg/l NAA là môi trường thích hợp tạo PLB, cho số PLB/mẫu cao nhất (6.62) và tỷ lệ mẫu tạo PLB cũng cao nhất (86.63%) ở độ tin cậy 95% (Bảng 3.16, Hình 3.23).

Vậy, môi trường nuôi cấy bổ sung 1.0 mg/l BA và 0.5 mg/l NAA là môi trường thích hợp tạo PLB Hoàng thảo dẹt.

Hình 3.23. Ảnh hưởng của BA và NAA đến quá trình hình thành PLB Hoàng thảo dẹt.

- Ảnh hưởng của TDZ kết hợp NAA đến khả năng hình thành PLB

TDZ là một chất hóa học tổng hợp, có tác động mạnh với đặc tính sinh học đặc biệt vừa hoạt động giống cytokinin vừa hoạt động giống auxin, được sử dụng như chất điều hoà sinh trưởng thực vật nhân tạo trong nuôi cấy mô (Murthy và cs., 1995). TDZ gây ra những phản ứng khác nhau trong quá trình nuôi cấy mô từ việc cảm ứng tạo mô sẹo đến sự hình thành phôi soma đối với cây thân gỗ.

Chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của NAA (0; 0.5 mg/l) kết hợp với TDZ (0.05; 0.1; 0.5; 1.0; 2.0 mg/l) lên sự hình thành PLB Hoàng thảo dẹt. Kết quả sau 45 ngày nuôi cấy được thể hiện ở bảng 3.17.

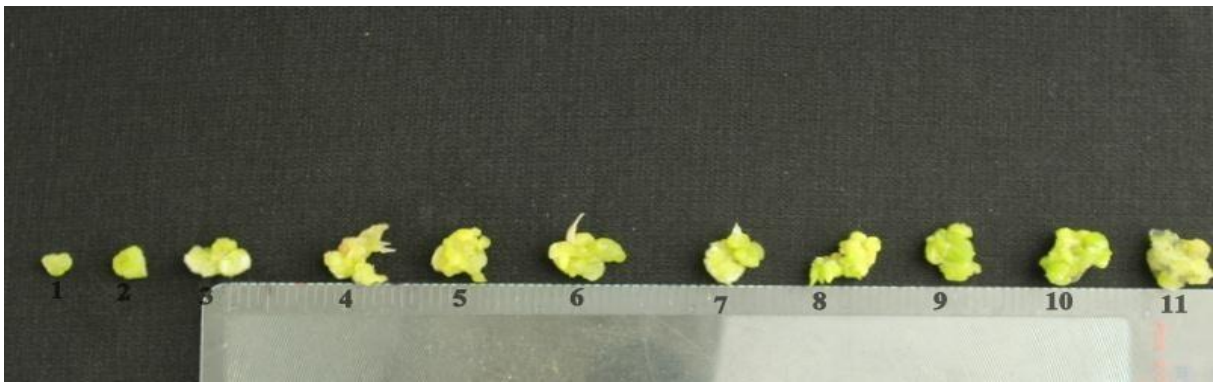
Bảng 3.17. Ảnh hưởng của TDZ và NAA đến quá trình hình thành PLB Hoàng thảo dẹt.

TDZ (mg/l)	NAA (mg/l)	Số PLB/mẫu	Tỷ lệ tạo PLB (%)
0	0	1.60^{h}	33.30^{h*}
0.05	0	3.20^{g}	40.00^{g}
0.1	0	3.27^{g}	46.70^{f}
0.5	0	3.73^{f}	53.30^{e}
1.0	0	4.22^{e}	57.77^{d}
1.5	0	5.33^{bc}	66.70^{c}
0.05	0.5	3.22^{g}	51.10^{e}
0.1	0.5	4.95^{d}	66.47^{c}
0.5	0.5	5.87^{b}	73.30^{b}
1.0	**0.5**	$\mathbf{7.11^{a}}$	$\mathbf{82.20^{a}}$
1.5	0.5	5.69^{bc}	71.10^{b}

*Ghi chú: *: Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Kết quả ở bảng 3.17 cho thấy trong môi trường có bổ sung chất kích thích TDZ hoặc kết hợp NAA thì khả năng hình thành PLB được cảm ứng mạnh đối với mẫu cấy. Trong môi trường đối chứng cho số PLB và tỷ lệ mẫu tạo PLB thấp. Còn ở các môi trường nuôi cấy khi bổ sung TDZ cho thấy số PLB và tỷ lệ mẫu tạo PLB tăng cao, đặc biệt khi kết hợp TDZ với NAA thì hiệu quả hơn. Như vậy, khả năng tạo PLB phụ thuộc vào nồng độ tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng TDZ và NAA có trong môi trường.

Khi sử dụng môi trường nuôi cấy MS bổ sung riêng rẽ hay kết hợp TDZ và NAA cho số PLB/mẫu dao động trong khoảng từ 3.20 - 7.11 PLB/mẫu và tỷ lệ mẫu tạo PLB đạt từ 40.00% - 82.20%. Đặc biệt, môi trường nuôi cấy bổ sung 1.0 mg/l TDZ và 0.5 mg/l NAA là môi trường thích hợp tạo PLB, cho số PLB/mẫu cao nhất (7.11) và tỷ lệ mẫu tạo PLB cũng cao nhất (82.20%). Tuy nhiên, nếu tăng nồng độ chất điều hòa sinh trưởng TDZ lên thì số PLB/mẫu và tỷ lệ mẫu tạo PLB lại giảm đi, đặc biệt khi nồng độ TDZ tăng lên 2.0 mg/l và 0.5 mg/l NAA thì mẫu tạo PLB bị mọng nước, màu vàng rồi chết dần (Hình 3.24).



Hình 3.24. Ảnh hưởng của TDZ và NAA đến quá trình hình thành PLB Hoàng thảo dẹt.

Vậy, môi trường nuôi cấy bổ sung 1.0 mg/l TDZ và 0.5 mg/l NAA là môi trường thích hợp tạo PLB Hoàng thảo dẹt.

b. Nghiên cứu tái sinh chồi in vitro

- Ảnh hưởng của BA đến sự hình thành và phát triển của chồi cây in vitro

BA là chất điều hòa sinh trưởng nhân tạo thuộc nhóm cytokinin, là nhóm được sử dụng rộng rãi nhất trong kỹ thuật nuôi cấy mô hiện nay. Tác dụng chủ yếu của BA là kích thích sự phân chia tế bào, thúc đẩy sự hoạt động của chồi bên. BA được sử dụng với nồng độ khác nhau tuỳ thuộc vào đối tượng thực vật nuôi cấy, chẳng hạn ở nồng độ 22 µM thích hợp với sự phát triển chồi của *Cymbidium aloifolium*, nhưng đối với *D. aphyllum* và *D. moschatum*, nồng độ thích hợp nhất cho sự phát triển của chồi là 44 µM. (Nayak và cs., 1997).

Dựa trên nghiên cứu của một số tác giả trên đối tượng lan *Dendrobium*, chúng tôi tiến hành nghiên cứu thăm dò bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy MS bổ sung BA ở các nồng độ 0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 và 2.5 mg/l. Sau 60 ngày nuôi

cấy, khả năng hình thành và sinh trưởng chồi cây Hoàng thảo dẹt được thể hiện ở bảng 3.18.

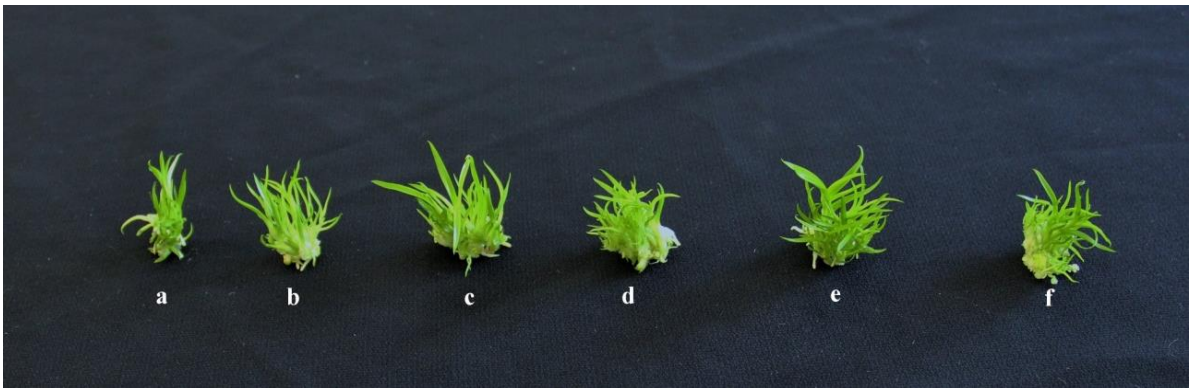
Bảng 3.18. Ảnh hưởng của hàm lượng BA đến sự hình thành và phát triển của chồi cây Hoàng thảo dẹt.

BA (mg/l)	Số chồi/cụm	Chiều cao chồi (cm)
0	8.60^{e}	1.35^{e*}
0.5	18.60^{b}	1.63^{cd}
1.0	19.02^{b}	1.74^{ab}
1.5	**21.51^{a}**	**1.83^{a}**
2.0	16.00^{c}	1.72^{bc}
2.5	14.29^{d}	1.56^{d}

*Ghi chú: *: Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Kết quả bảng 3.18 cho thấy Hoàng thảo dẹt có sự hình thành và phát triển của chồi cây tốt nhất trên môi trường bổ sung 1.5 mg/l BA, chiều cao chồi đạt 1.83 cm với 21.51 chồi/cụm (Hình 3.25d). Khi nồng độ của BA tăng 0 - 1.5 mg/l thì sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi tăng lên nhưng khi nồng độ BA tăng lên từ 2.0 - 2.5 mg/l thì sự hình thành chồi và sinh trưởng chồi cây giảm xuống. Điều này cho thấy nồng độ BA từ 0 - 1.5 mg/l có tác dụng thúc đẩy các protocorms phát triển thành chồi cây nhưng khi nồng độ BA tăng lên 2.0 - 2.5 mg/l sẽ có tác dụng kìm hãm các protocorms phát triển thành chồi cây. BA là chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin có vai trò quan trọng trong phân chia tế bào và kích thích sự hình thành chồi. Bởi vậy, trong nuôi cấy mô tế bào thực vật BA thường được sử dụng trong giai đoạn nhân nhanh. Nồng độ của BA được sử dụng trong nhân giống *in vitro* ở những loại cây khác nhau là khác nhau, có loại cây thích hợp ở nồng độ thấp, có loại cây thích hợp ở nồng độ cao. BA đã được sử dụng nghiên cứu nhân giống trên nhiều loại lan Hoàng thảo khác như: *D. aggregatum* (Vijayakumar và cs., 2012); *D. chrysanthum* Wall. Ex Lindl.(Rao và Barman, 2014)... Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết quả của Sana Asghar và cs. (2011) khi nghiên cứu nhân giống *in vitro* lan *D. nobile* var. Emma white.

Như vậy môi trường nuôi cấy MS bổ sung 1.5 mg/l BA thích hợp cho sự hình thành và phát triển chồi cây Hoàng thảo dẹt.



Hình 3.25. Ảnh hưởng của hàm lượng BA đến sự hình thành và phát triển chồi cây Hoàng thảo dẹt. (a). ĐC; (b) 0.5 mg/l BA; (c) 1.0 mg/l BA; (d) 1.5 mg/l BA; (e) 2.0 mg/l BA; (f) 2.5 mg/l BA.

- Ảnh hưởng của Kin đến sự hình thành và phát triển của chồi cây in vitro

Kin là sản phẩm được phát hiện đầu tiên khi Skoog (1950) tiến hành thí nghiệm chiết xuất axit nucleic. Chúng được tạo ra bằng cách phân lập từ chế phẩm ADN cũ hoặc axit nucleic mới sau khi hấp ở nhiệt độ cao hoặc đun sôi, Kin có tác dụng kích thích sự phát sinh chồi của thực vật (Lê Trần Bình và cs., 2002). Dựa trên những đặc tính của Kin, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của Kin lên sự hình thành và phát triển của chồi Hoàng thảo dẹt. Kết quả sau 60 ngày nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung Kin ở các thang nồng độ từ 0; 0.5; 1.0; 1.5 mg/l được thể hiện ở bảng 3.19.

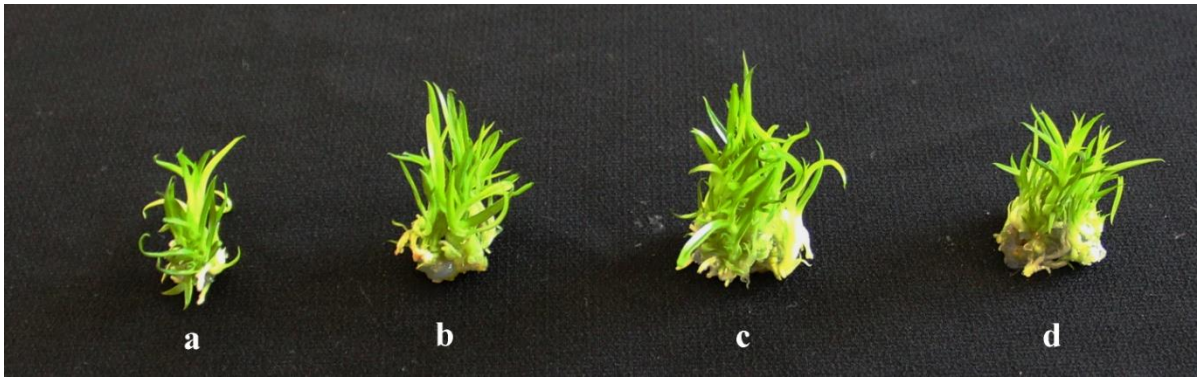
Bảng 3.19. Ảnh hưởng của Kin đến sự hình thành và phát triển của chồi cây Hoàng thảo dẹt.

Kin (mg/l)	Số chồi/cụm	Chiều cao chồi (cm)
0	8.60^{c}	1.35^{d*}
0.5	14.55^{b}	1.53^{c}
1.0	**19.53^{a}**	**1.72^{a}**
1.5	15.29^{b}	1.63^{b}

*Ghi chú: *: Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Qua bảng 3.19 cho thấy, môi trường bổ sung 1.0 mg/l Kin có ảnh hưởng tốt nhất đến khả năng hình thành và phát triển của chồi cây Hoàng thảo dẹt, chiều cao chồi trung bình đạt 1.72 cm với 19.53 chồi/cụm (Hình 3.26c). Trong môi trường đối chứng không bổ sung Kin số chồi trung bình/mẫu cũng như chiều cao chồi đều thấp hơn so với môi trường có bổ sung Kin. Khi nồng độ Kin tăng số chồi tạo thành có xu hướng giảm đi điều đó chứng tỏ ở nồng độ cao Kin đã ức chế sự hình thành chồi mới. Theo Babu và cs. (2003) môi trường có nồng độ cytokinin cao

làm cho số chồi giảm, khả năng hình thành cụm chồi kém. Điều này cũng phù hợp với nhận định của Rayle và cs. (1982) là cytokinin ngăn cản sự kéo dài trong thân.



Hình 3.26. Ảnh hưởng của Kin đến sự hình thành và phát triển của chồi cây Hoàng thảo dẹt ở các nồng độ khác nhau. (a) 0 mg/l Kin; (b) 0.5 mg/l Kin; (c) 1.0 mg/l Kin; (d) 1.5 mg/l Kin.

Như vậy, môi trường bổ sung 1.0 mg/l Kin có ảnh hưởng tốt nhất đến khả năng hình thành và phát triển của chồi cây Hoàng thảo dẹt.

- Ảnh hưởng của dịch nghiền củ, quả lên sự hình thành và sinh trưởng chồi cây

Mỗi bình thí nghiệm cấy 3 cụm chồi có chiều cao 6 mm, mỗi cụm có chứa 03 chồi được đưa vào nuôi cấy trên nền môi trường MS có bổ sung các dịch nghiền khoai tây, chuối và cà rốt, qua đó xác định được ảnh hưởng của các chất bổ sung này đến sự hình thành và sinh trưởng chồi cây. Kết quả sau 60 ngày nuôi cấy được thể hiện ở bảng 3.20.

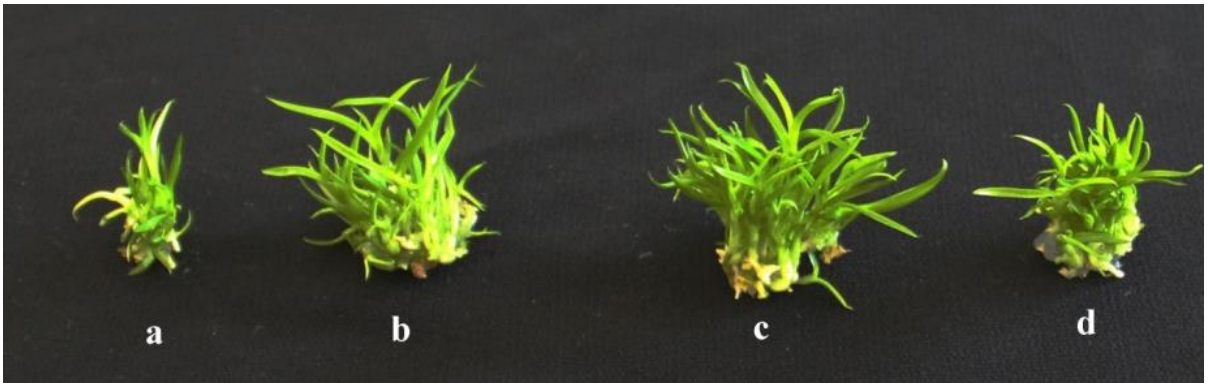
Bảng 3.20. Ảnh hưởng của hàm lượng dịch nghiền củ, quả đến sự hình thành và phát triển của chồi cây Hoàng thảo dẹt.

Nghiệm thức	Số chồi/cụm	Chiều cao chồi (cm)
Đối chứng	8.60^{d*}	1.35^{d}
100 g khoai tây/l môi trường	18.29^{b}	1.72^{b}
100 g chuối chín/l môi trường	**23.84^{a}**	**2.22^{a}**
100 g cà rốt/l môi trường	16.69^{c}	1.64^{c}

*Ghi chú: *: Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Kết quả thu được ở bảng 3.20 cho thấy, đối với môi trường bổ sung dịch nghiền sự hình thành và phát triển chồi cây tốt hơn môi trường đối chứng không bổ sung dịch nghiền. So sánh sự sinh trưởng của chồi ở môi trường có chứa các dịch nghiền thì dịch nghiền chuối có tác động tối ưu đến sự sinh trưởng, phát triển của chồi cây *in vitro* trong giai đoạn nhân nhanh, cao hơn 2 dịch nghiền còn lại, số chồi/cụm là 23.84 chồi/cụm và chiều cao chồi đạt 2.22 cm (Hình 3.27c). Theo

Van và cs. (1975) thì trong chuối chín có rất nhiều thành phần, các hợp chất quan trọng về mặt sinh lý là serotinin, norepinephrine cùng với dopamin và một số catecholamine chưa xác định. Việc bổ sung dịch nghiền chuối vào môi trường nuôi cấy hoa lan thường kích thích sự sinh trưởng bởi nó có tác dụng ổn định pH của môi trường và chứa hợp chất có hoạt tính cytokinin tự nhiên. Mỗi loài khác nhau phù hợp với nồng độ chất bổ sung vào môi trường khác nhau. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Thị Sơn và cs. (2014) khi bổ sung 60 g chuối chín/l môi trường khi nhân nhanh cụm chồi lan *D. officinale*. Shu và cs. (2004) đã công bố môi trường nhân nhanh chồi trên cây lan dược liệu *Dendrobium tosaense* là môi trường có bổ sung 8% dịch nghiền chuối. Công bố là trùng lặp với nghiên cứu của chúng tôi vì đều chỉ rõ được hiệu quả của dịch chiết chuối chín.



Hình 3.27. Ảnh hưởng của hàm lượng dịch nghiền củ, quả đến sự hình thành và phát triển của chồi cây Hoàng thảo dẹt. (a). ĐC; (b) 100 g khoai tây/l môi trường; (c) 100 g chuối chín/l môi trường; (d) 100 g cà rốt/l môi trường.

Như vậy, môi trường nuôi cấy MS bổ sung 100g chuối chín/l môi trường thích hợp có sự hình thành và sinh trưởng chồi cây Hoàng thảo dẹt.

c. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng (IAA, IBA, NAA) đến khả năng tái sinh rễ in vitro

Chồi của loài Hoàng thảo dẹt được tách riêng rẽ và cấy lên môi trường nuôi cấy có bổ sung chất kích thích sinh trưởng IAA, IBA, NAA ở các nồng độ lần lượt 0.5; 1.0; 1.5 mg/l để khảo sát khả năng hình thành rễ. Kết quả thí nghiệm sau 60 ngày theo dõi được trình bày ở bảng 3.21.

Bảng 3.21. Ảnh hưởng của IAA, IBA, NAA lên sự hình thành rễ Hoàng thảo dẹt.

IAA (mg/l)	IBA (mg/l)	NAA (mg/l)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)
0	0	0	66.67	2.67^{f}	1.10^{e*}
0.5	0	0	88.89	3.00^{ef}	1.43^{d}

1.0	0	0	93.33	2.80^{ef}	1.44^{d}
1.5	0	0	91.11	4.00^{cd}	1.55^{cd}
0	0.5	0	95.56	4.67^{b}	1.79^{bc}
0	**1.0**	0	**100.00**	**5.67^{a}**	**3.54^{a}**
0	1.5	0	97.78	4.47^{bc}	2.00^{b}
0	0	0.5	88.89	3.40^{de}	1.59^{cd}
0	0	1.0	93.33	3.47^{de}	1.52^{cd}
0	0	1.5	84.44	2.67^{f}	1.30^{de}

*Ghi chú: *: Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Qua bảng 3.21 kết quả cho thấy các nghiệm thức có môi trường nuôi cấy bổ sung 1.0 mg/l IBA cho tỷ lệ chồi ra rễ tối ưu đạt 100% với số rễ trung bình là 5.67 rễ/chồi và chiều dài rễ trung bình đạt 3.54 cm (Hình 3.28D5). Ở nghiệm thức đối chứng tỷ lệ ra rễ vẫn đạt 66.67%, cho thấy loài này có khả năng ra rễ mạnh. Vũ Ngọc Lan và Nguyễn Thị Lý Anh (2013) cũng đã nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài này, khác với nghiên cứu của chúng tôi các tác giả sử dụng môi trường RE (Robert Ernst, 1979) để thí nghiệm sự ra rễ, số lượng rễ đạt được cao nhất là 3.46 rễ/chồi với chiều dài rễ 2.12 cm. Kết quả nghiên cứu loài Hoàng thảo dẹt của chúng tôi phù hợp với kết quả của Kabir và cs. (2013) khi nghiên cứu loài *D. fimbriatum*, các tác giả thí nghiệm với hai loại môi trường là MS và ½MS, có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng IBA ở các nồng độ từ 0.1 mg/l - 2.0 mg/l, kết quả đạt được tốt nhất là môi trường ½MS + 1.0 mg/l IBA cho sự ra rễ với chiều dài rễ trung bình là 5.20 cm, số rễ là 9.3 rễ/chồi.

Hình 3.28. Sự hình thành rễ của chồi Hoàng thảo dẹt ở các nồng độ chất kích thích IAA, IBA, NAA lần lượt 0; 0.5; 1.0; 1.5 mg/l.

Như vậy, môi trường nuôi cấy ½MS bổ sung 1.0 mg/l IBA thích hợp cho khả năng tái sinh rễ *in vitro* Hoàng thảo dẹt.

3.2.2.7. Một số yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của Lan Hài vàng trong nuôi cấy in vitro

a. Ảnh hưởng của dịch chiết củ, quả lên sự hình thành và sinh trưởng chồi cây

Đối với Lan Hài vàng, chúng tôi tiến hành các thí nghiệm nhân nhanh chồi, kết quả sau 60 ngày nuôi cấy được thể hiện ở bảng 3.22.

Bảng 3.22. Ảnh hưởng của dịch chiết khoai tây, cà rốt và chuối đến khả năng hình thành và phát triển của chồi cây Lan Hài vàng.

Nghiệm thức	Số chồi/cụm	Chiều dài chồi (cm)
Đối chứng	1.06^{d}	2.10^{c*}
60 g khoai tây/l môi trường	2.97^{c}	2.60^{b}
60 g chuối/l môi trường	**5.57^{a}**	**2.99^{a}**
60 g cà rốt/l môi trường	3.50^{b}	2.30^{c}

*Ghi chú: *: Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Kết quả thu được ở bảng 3.22 cho thấy, đối với môi trường bổ sung dịch chiết sự hình thành và phát triển chồi cây tốt hơn môi trường không bổ sung dịch chiết. Chen và cs. (1999) khi nghiên cứu nhân giống lan *Oncidium* thu được kết quả sự sinh trưởng của cây tốt nhất trên môi trường bổ sung các dịch chiết chuối, cà rốt, khoai tây, nước dừa và tryptophan. Các dịch chiết chuối, khoai tây, khoai sọ có chứa niacin và một số vitamin; kích thích sự nảy mầm và sinh trưởng của cây lan (Islam và cs., 2000). Trong nghiên cứu này, khi bổ sung riêng lẻ dịch chiết khoai tây, cà rốt vào môi trường nuôi cấy chồi thu được có màu vàng nhạt, thân mảnh; sự hình thành và phát triển chồi cây tốt nhất trên môi trường MS bổ sung 60 g chuối/lít môi trường cho số chồi/cụm nhiều nhất (5.57 chồi/cụm), chiều cao chồi đạt 2.99 cm/chồi và chồi có màu xanh đậm.

Như vậy, môi trường MS bổ sung 60 g chuối/lít môi trường là tối ưu cho nhân nhanh cụm chồi loài Lan Hài vàng.

b. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng (IAA, IBA, NAA) đến khả năng tái sinh rễ in vitro

Các thí nghiệm ra rễ được tiến hành trên những chồi Lan Hài vàng có chiều cao trong khoảng từ 3 - 5 cm. Chồi được cấy lên môi trường nuôi cấy có bổ sung các chất kích thích sinh trưởng IBA, NAA và IAA lần lượt ở các nồng độ 0.5 mg/l; 1.0 mg/l; 1.5 mg/l để tìm ra môi trường thích hợp cho việc ra rễ, chuẩn bị đưa ra ngoài vườn ươm trồng. Kết quả sau 60 ngày nuôi cấy được thể hiện ở bảng 3.23.

Bảng 3.23. Ảnh hưởng của IAA, IBA, NAA lên sự ra rễ của loài Lan Hài vàng.

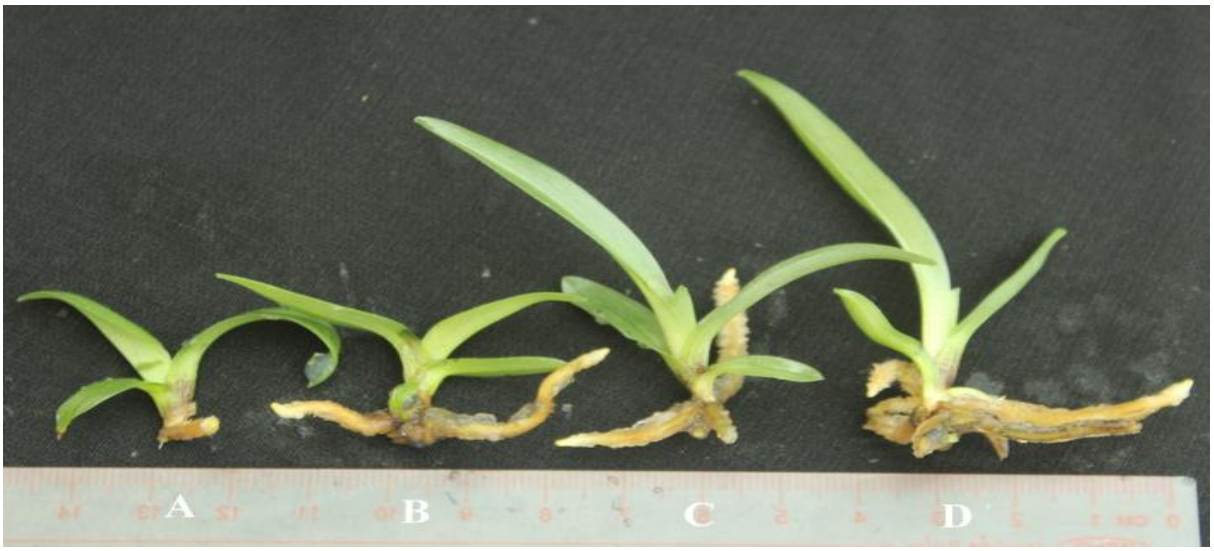
IAA (mg/l)	IBA (mg/l)	NAA (mg/l)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)			Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)
			30 ngày	45 ngày	60 ngày		
-	-	-	24.45	33.34	48.89	1.00^{e*}	0.82^{g}
0.5	-	-	33.34	40.00	60.00	1.54^{de}	1.50^{ef}
1.0	-	-	35.56	51.11	64.44	2.20^{bc}	1.89^{cd}
1.5	-	-	31.12	42.22	62.22	1.80^{cd}	1.72^{de}
-	0.5	-	26.67	37.78	57.78	1.00^{de}	1.30^{f}
-	1.0	-	28.89	35.56	55.56	1.80^{cd}	1.49^{ef}
-	1.5	-	31.12	44.44	64.44	1.27^{de}	1.28^{f}
-	-	0.5	37.78	60.00	71.11	2.60^{ab}	2.12^{c}
-	**-**	**1.0**	**51.11**	**77.78**	**93.34**	**3.00^{a}**	**2.68^{a}**
-	-	1.5	46.67	75.56	88.89	2.80^{ab}	2.43^{b}

*Ghi chú: *: Những chữ cái khác nhau (a, b, c…) trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Từ bảng 3.23 cho thấy từ 30 ngày ở các nghiệm thức đều có sự tạo rễ, tuy nhiên ở các nghiệm thức có bổ sung NAA thì số rễ và chiều dài rễ cao nhất. Đến 60 ngày, ở các nghiệm thức đều cho tỷ lệ ra rễ trên 50.00%, riêng nghiệm thức đối chứng (không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng) tỷ lệ ra rễ 48.89%. Ở các nghiệm thức có bổ sung NAA từ nồng độ 0.5 - 1.5 mg/l cho số lượng rễ từ 2.60 - 3.00 rễ/chồi. Tại nghiệm thức bổ sung 1.0 mg/l NAA có sự khác biệt rõ về cả số rễ/chồi và chiều dài rễ, số rễ đạt được là 3.00 rễ/chồi, chiều dài rễ là 2.68 cm, các chóp rễ phát triển mạnh, thuận lợi cho sự sinh trưởng và phát triển của chồi và rễ ở giai đoạn ngoài vườn ươm. Khi tăng nồng độ NAA lên 1.5 mg/l, các chóp rễ có hiện tượng ngừng sinh trưởng, gây bất lợi cho sự sinh trưởng và phát triển tiếp theo của rễ ngoài vườn ươm. Kết quả này của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Songjun và cs. (2013) sử dụng 1.0 mg/l NAA cho quá trình ra rễ của *P. hangianum*. Cho và cs. (1987) sử dụng NAA ở nồng độ 1.0 mg/l và IBA 0.5 mg/l cho quá trình ra rễ của cây *P. philippinense*.

Ở các môi trường có bổ sung IAA và IBA cũng có sự hình thành rễ nhưng với tỷ lệ thấp hơn các nghiệm thức bổ sung NAA. Cao nhất trong nhóm này là nghiệm thức bổ sung 1.0 mg/l IAA chỉ đạt 2.20 rễ/chồi, tỷ lệ ra rễ cao nhất là 64.44%. Đối với IBA thì cao nhất là nghiệm thức bổ sung 1.0 mg/l IBA có trung bình 1.80 rễ/chồi và chiều dài rễ đạt 1.49 cm. Đồng thời với các môi trường có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng như trên thì môi trường đối chứng không bổ sung IAA, IBA, NAA cũng có sự hình thành rễ, điều này cho thấy khả năng ra rễ của

Lan Hài là rất mạnh. Ting và cs. (2001) sử dụng các chồi khỏe mạnh cấy trên môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng và thu được từ 1 - 3 rễ/chồi sau 22 tháng. Theo Chyuam và cs. (2011) báo cáo các cây con có chiều cao 1 cm được cấy vào môi trường ½MS có bổ sung 60 g/l khoai tây và không có chất điều hòa sinh trưởng, sau 12 tuần nuôi cấy đã hình thành rễ của giống Lan hài *P. rothschildianum.*



Hình 3.29. Sự hình thành rễ của chồi Lan Hài vàng ở các điều hòa sinh trưởng khác nhau. A. ĐC; B. 1.0 mg/l IBA; C. 1.0 mg/l IAA; D. 1.0 mg/l NAA.

3.2.2.8. Một số yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu trong nuôi cấy in vitro

a. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng hình thành PLB

- Ảnh hưởng của BA đến khả năng hình thành PLB của Hạc đính bảo lộc

Sau khi tiến hành vào mẫu chồi 30 ngày, chọn những mẫu mô chứa đỉnh sinh trưởng được tách ra có kích thước khoảng 0.8 mm, mang một phát thể lá chuyển vào môi trường MS có bổ sung BA với các nồng độ khác nhau để tiến hành thí nghiệm. Kết quả thu được thể hiện ở bảng 3.24.

Bảng 3.24. Ảnh hưởng của BA đến hình thành PLB Hạc đính bảo lộc.

BA (mg/l)	Số PLB/mẫu	Tỷ lệ tạo PLB (%)
0	1.84^{e*}	29.00
0.5	4.42^{d}	43.70
1.0	**5.98^{a}**	**65.55**
1.5	5.22^{b}	50.43
2.0	4.31^{c}	50.00

*Ghi chú: *: Những chữ cái khác nhau (a, b, c…) trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Dựa vào bảng 3.24 cho thấy có sự ảnh hưởng khác biệt giữa các yếu tố môi trường lên khả năng tạo PLB sau 45 ngày nuôi cấy, đối với môi trường bổ sung chất kích thích sinh trưởng số PLB/mẫu cao hơn môi trường không bổ sung chất kích thích sinh trưởng (nghiệm thức đối chứng). Ở môi trường đối chứng 29.00% mẫu tạo PLB với 1.84 PLB/mẫu cấy. Ở các môi trường bổ sung BA số PLB/mẫu dao động trong khoảng từ 4.31 PLB/mẫu đến 5.98 PLB/mẫu và tỷ lệ mẫu tạo PLB đạt trong khoảng từ 43.70% đến 65.55%. Trong đó môi trường thích hợp cho sự tạo PLB của loài Hạc đính bảo lộc là môi trường MS bổ sung 1.0 mg/l BA có số PLB/mẫu là 5.98 và tỷ lệ tạo PLB là 65.55%. Khi nồng độ BA tăng lên 1.5 mg/l và 2.0 mg/l thì số PLB/mẫu và tỷ lệ tạo PLB lần lượt giảm xuống chỉ còn 5.22 PLB/mẫu và 50.43% (ở môi trường bổ sung 1.5 mg/l); 4.31 PLB/mẫu và 50.00% (ở môi trường bổ sung 2.0 mg/l). Bijaya và cs. (2011) khi nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài *Phaius tancarvilleae* cũng cho kết quả môi trường MS bổ sung 0.5 mg/l BA là môi trường thích hợp cho sự hình thành và nhân nhanh PLB.

Vậy, ở thí nghiệm này môi trường tối ưu cho sự hình thành PLB của Hạc đính bảo lộc là môi trường MS bổ sung 1.0 mg/l BA.

- Ảnh hưởng của BA kết hợp với NAA đến khả năng hình thành PLB của Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu

Sau khi tiến hành thí nghiệm trên, chúng tôi tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của BA (1.0 mg/l) kết hợp NAA (0; 0.5; 1.0; 1.5 mg/l) lên khả năng hình thành PLB của cả hai loài. Kết quả sau 45 ngày nuôi cấy được thể hiện ở bảng 3.25.

Bảng 3.25. Ảnh hưởng của BA kết hợp NAA đến hình thành PLB Hạc đỉnh bảo lộc và Hạc đính nâu.

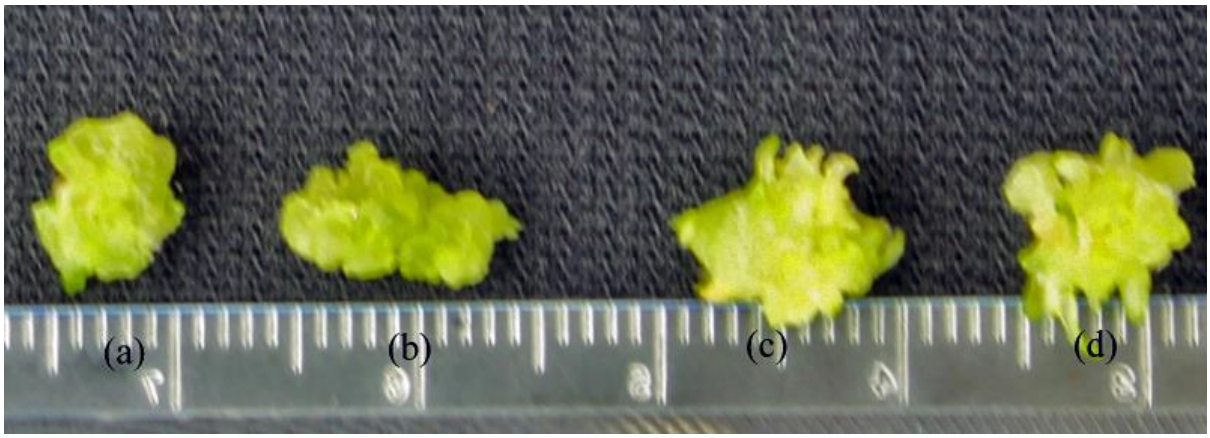
Chất ĐHST / Loài		Hạc đính bảo lộc		Hạc đính nâu	
BA (mg/l)	**NAA (mg/l)**	**Số PLB/mẫu**	**Tỷ lệ tạo PLB (%)**	**Số PLB/mẫu**	**Tỷ lệ tạo PLB (%)**
1.0	0	5.98^{d*}	65.55	5.57^{c}	53.11
1.0	0.5	7.31^{c}	69.93	7.51^{b}	70.00
1.0	**1.0**	**9.71^{a}**	**90.04**	**10.18^{a}**	**85.55**
1.0	1.5	8.04^{b}	79.78	8.29^{b}	74.44

*Ghi chú: *: Những chữ cái khác nhau (a, b, c…) trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Kết quả bảng 3.25 cho thấy có sự ảnh hưởng khác biệt giữa các yếu tố môi trường lên khả năng tạo PLB, đối với môi trường bổ sung BA kết hợp NAA số PLB/mẫu cũng như tỷ lệ tạo PLB cao hơn môi trường chỉ bổ sung BA (nghiệm

thức đối chứng). Đối với loài Hạc đính bảo lộc ở môi trường bổ sung 1.0 mg/l BA và 0.5 mg/l NAA số PLB/mẫu là 7.31 PLB/mẫu và 69.93% mẫu tạo PLB. Đặc biệt khi tăng nồng độ lên 1.0 mg/l NAA kết hợp 1.0 mg/l BA kết quả cho số PLB hình thành cao nhất đạt 9.71 PLB/mẫu với tỷ lệ tạo PLB là 90.04%. Tuy nhiên khi tiếp tục tăng nồng độ NAA lên 1.5 mg/l thì số PLB/mẫu cũng như tỷ lệ tạo PLB đều giảm chỉ đạt 8.04 PLB/mẫu và 79.78% mẫu tạo PLB.

Đối với loài Hạc đính nâu số PLB/mẫu ở các nghiệm thức dao động trong khoảng từ 5.57 PLB/mẫu đến 10.18 PLB/mẫu và tỷ lệ mẫu tạo PLB đạt trong khoảng từ 53.11% đến 85.55%. Khi bổ sung chất kích thích sinh trưởng, tỷ lệ mẫu tạo PLB đều trên 70.00%, trong đó môi trường bổ sung 1.0 mg/l BA kết hợp 1.0 mg/l NAA thì tỷ lệ mẫu tạo PLB là cao nhất đạt 85.55%, cũng trong môi trường này số PLB hình thành cao nhất đạt 10.18 PLB/mẫu (Hình 3.30c). Tuy nhiên, nếu tăng nồng độ NAA lên thì số PLB trên mẫu và tỷ lệ mẫu tạo PLB lại giảm đi. Có thể thấy khả năng tạo PLB phụ thuộc vào nồng độ tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng có trong môi trường và sự kết hợp giữa BA và NAA làm tăng hiệu quả hình thành PLB. Theo Rocky và cs. (2017) khi nghiên cứu nhân giống loài *Phaius tankervilliae* cho kết quả môi trường thích hợp để nhân nhanh PLB là môi trường bổ sung 1.0 mg/l NAA kết hợp 1.0 mg/l Kin. Như vậy, ở cùng giai đoạn thì mỗi loài khác nhau thì sẽ thích hợp với các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau.



Hình 3.30. Ảnh hưởng của BA kết hợp NAA đến hình thành PLB loài Hạc đính nâu. (a) 1.0 mg/l BA + 0 mg/l NAA; (b) 1.0 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA; (c) 1.0 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA; (d) 1.0 mg/l BA + 1.5 mg/l NAA.

Vậy, môi trường nuôi cấy MS bổ sung 1.0 mg/l NAA kết hợp 1.0 mg/l BA là môi trường tối ưu tạo PLB đối với Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu ở thí nghiệm này.

- Ảnh hưởng của TDZ kết hợp NAA đến khả năng hình thành PLB của Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu

Hiện nay, TDZ được ứng dụng rộng rãi trong nuôi cấy mô tế bào thực vật trên nhiều đối tượng cây trồng, tuy nhiên các nghiên cứu sử dụng TDZ trong việc

nhân giống *in vitro* cây hoa lan còn ít, đặc biệt đối với các loài thuộc chi *Phaius* thì chưa có tác giả nào nghiên cứu về ảnh hưởng của TDZ.

Khả năng hình thành PLB sau 45 ngày nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung TDZ (0.5; 1.0; 1.5; 2.0 mg/l) kết hợp NAA (1.0 mg/l) được thể hiện ở bảng 3.26.

Bảng 3.26. Ảnh hưởng của TDZ kết hợp NAA đến hình thành PLB Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu

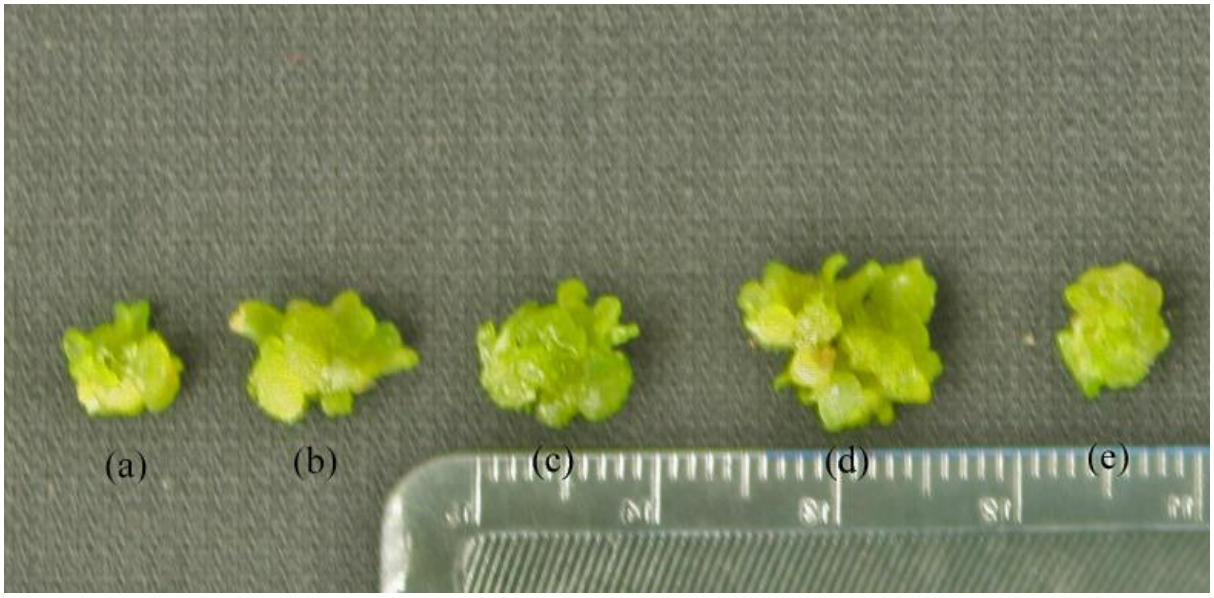
KTST \ Loài		Hạc đính bảo lộc		Hạc đính nâu	
TDZ (mg/l)	**NAA (mg/l)**	**Số PLB/mẫu**	**Tỷ lệ tạo PLB (%)**	**Số PLB/mẫu**	**Tỷ lệ tạo PLB (%)**
0	0	1.84^{e}	29.00	1.72^{d*}	29.53
0.5	1.0	8.71^{d}	75.55	8.18^{c}	54.55
1.0	1.0	10.55^{c}	86.00	9.84^{b}	79.11
1.5	**1.0**	**13.04^{a}**	**91.71**	**12.25^{a}**	**93.78**
2.0	1.0	11.31^{b}	89.71	9.56^{b}	65.56

*Ghi chú: *: Những chữ cái khác nhau (a, b, c…) trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Qua bảng 3.26 cho thấy, sau 45 ngày nuôi cấy PLB được cảm ứng hình thành mạnh trong môi trường có bổ sung chất kích thích TDZ kết hợp NAA. Ở loài Hạc đính bảo lộc, môi trường đối chứng cho số PLB thấp nhất là 1.84 PLB/mẫu và 29.00% mẫu tạo PLB. Trong khi đó ở các môi trường nuôi cấy khi bổ sung TDZ kết hợp với NAA thì tạo PLB hiệu quả hơn với số PLB và tỷ lệ mẫu tạo PLB tăng. Khi sử dụng môi trường nuôi cấy bổ sung TDZ kết hợp NAA ở các nồng độ khác nhau số PLB/mẫu dao động trong khoảng từ 8.71 PLB/mẫu đến 13.04 PLB/mẫu và tỷ lệ mẫu tạo PLB đạt trong khoảng từ 75.55% đến 91.71%. Trong đó, môi trường nuôi cấy bổ sung 1.5 mg/l TDZ kết hợp 1.0 mg/l NAA là môi trường tối ưu cho số PLB/mẫu cao nhất (13.04 PLB/mẫu) và tỷ lệ mẫu tạo PLB cũng cao nhất (91.71%), PLB thu được hình cầu màu xanh vàng. Tuy nhiên, nếu nồng độ TDZ tăng thì số PLB trên mẫu và tỷ lệ tạo PLB lại giảm đi, đặc biệt khi nồng độ TDZ tăng lên 2.0 mg/l kết hợp 1.0 mg/l NAA thì PLB bị mọng nước, màu trắng vàng rồi chết dần.

Ở loài Hạc đính nâu, môi trường đối chứng cho số PLB thấp nhất 1.72 PLB/mẫu và 29.53% mẫu tạo PLB. Khi sử dụng môi trường nuôi cấy bổ sung TDZ kết hợp NAA ở các nồng độ khác nhau số PLB/mẫu dao động trong khoảng từ 8.18 PLB/mẫu đến 12.25 PLB/mẫu và tỷ lệ mẫu tạo PLB đạt trong khoảng từ 54.55% đến 93.78% (Hình 3.31). Trong đó, môi trường nuôi cấy bổ sung 1.5 mg/l TDZ kết hợp 1.0 mg/l NAA là môi trường tối ưu cho số PLB/mẫu cao nhất (12.25 PLB/mẫu) và tỷ lệ mẫu tạo PLB cũng cao nhất (93.78%). Kha Nữ Tú Uyên và cs.

(2015) đã sử dụng TDZ và NAA trong nhân giống lan *Renanthera* sp. cho kết quả bổ sung 1.0 mg/l TDZ là thích hợp với 51% mẫu phát sinh PLB.



Hình 3.31. Ảnh hưởng của TDZ kết hợp NAA đến hình thành PLB Hạc đính nâu. (a) 0 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA; (b) 0.5 mg/l TDZ + 1.0 mg/l NAA; (c) 1.0 mg/l TDZ + 1.0 mg/l NAA; (d) 1.5 mg/l TDZ + 1.0 mg/l NAA; (e) 2.0 mg/l TDZ + 1.0 mg/l NA.

Vậy, môi trường MS bổ sung 1.0 mg/l BA kết hợp 1.0 mg/l NAA hoặc môi trường MS bổ sung 1.5 mg/l TDZ kết hợp 1.0 mg/l NAA có thể được chọn làm môi trường tạo PLB trong nhân giống Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu.

b. Ảnh hưởng của một số chất điều hòa sinh trưởng lên sự tái sinh chồi của Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu

- Ảnh hưởng của BA lên sự tái sinh chồi Hạc đính bảo lộc

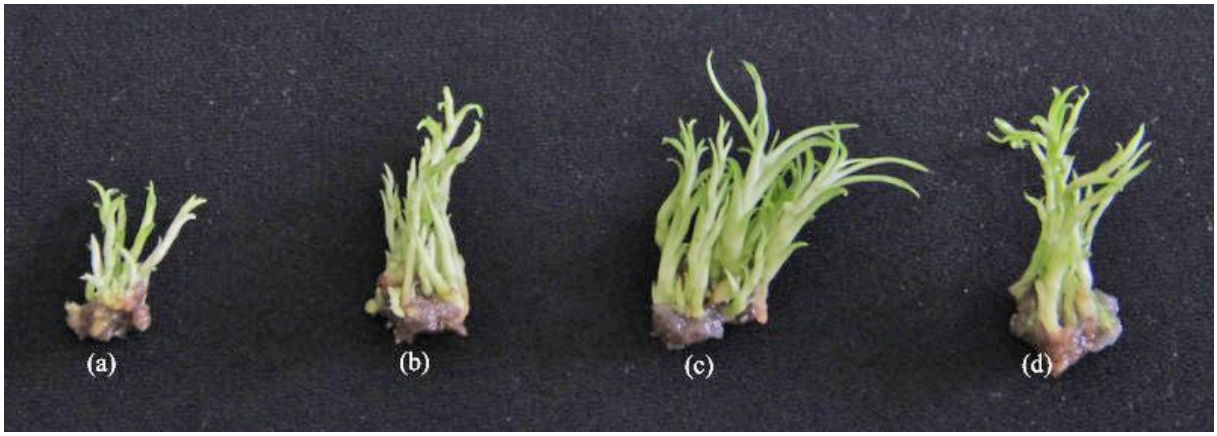
Việc xác định được nồng độ chất kích thích sinh trưởng tối ưu bổ sung vào môi trường nuôi cấy để hình thành và phát triển chồi, đồng thời các chồi đều đạt chất lượng tốt không bị biến dị trước khi chuyển sang môi trường tạo cây hoàn chỉnh là một yêu cầu không thể thiếu trong nhân giống *in vitro*. Trong thí nghiệm này chúng tôi tiến hành bổ sung BA ở các nồng độ (0; 0.5; 1.0; 1.5 mg/l) vào môi trường nuôi cấy MS để tìm ra nồng độ BA thích hợp cho sự hình thành và phát triển chồi Hạc đính bảo lộc. Sau 60 ngày nuôi cấy, khả năng hình thành và phát triển chồi được thể hiện ở bảng 3.27.

Bảng 3.27. Ảnh hưởng của hàm lượng BA đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro* Hạc đính bảo lộc.

BA (mg/l)	Số chồi/cụm	Chiều cao chồi (cm)
0	9.58^{c}	1.48^{c*}
0.5	17.49^{b}	1.71^{b}
1.0	**24.16^{a}**	**2.00^{a}**
1.5	18.62^{b}	1.65^{b}

*Ghi chú: *: Những chữ cái khác nhau (a, b, c…) trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Kết quả bảng 3.27 cho thấy ở các nghiệm thức có bổ sung BA cho số chồi/cụm và chiều cao chồi cao hơn so với nghiệm thức đối chứng không bổ sung BA. Tại nghiệm thức đối chứng chỉ đạt 9.58 chồi/cụm và chiều cao chồi là 1.48 cm (Hình 3.32a). Các nghiệm thức bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau các chỉ tiêu theo dõi tăng lên đáng kể, ở nồng độ 0.5 mg/l BA đạt 17.49 chồi/cụm và chiều cao chồi là 1.71 cm (Hình 3.32b). Khi nồng độ BA tăng lên 1.0 mg/l thì số chồi/cụm tăng lên 24.16 chồi/cụm và chiều cao chồi tăng lên đạt 2.00 cm (Hình 3.32c), tuy nhiên khi nồng độ BA tăng 1.5 mg/l các chỉ tiêu này giảm xuống lần lượt là 18.62 chồi/cụm và 1.65 cm đối với chiều cao chồi (Hình 3.32d). Đối với loài Hạc đính bảo lộc trong nghiên cứu này thì nồng độ thích hợp là 1 mg/l BA. Các nghiên cứu trên thế giới về chi *Phaius* hiện này rất hạn chế chủ yếu chỉ nghiên cứu loài *Phaius tankervilleae*. Kết quả của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Bijaya và Sumitra (2011) trên loài *Phaius tankervilleae*.



Hình 3.32. Ảnh hưởng của hàm lượng BA đến sự hình thành và phát triển của chồi Hạc đính bảo lộc lần lượt ở các nồng độ 0; 0.5; 1.0; 1.5 mg/l.

- Ảnh hưởng của Kin lên sự tái sinh chồi Hạc đính bảo lộc

Dựa trên những đặc tính của Kin, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của Kin lên sự hình thành và phát triển của chồi Hạc đính bảo lộc. Kết quả sau 60

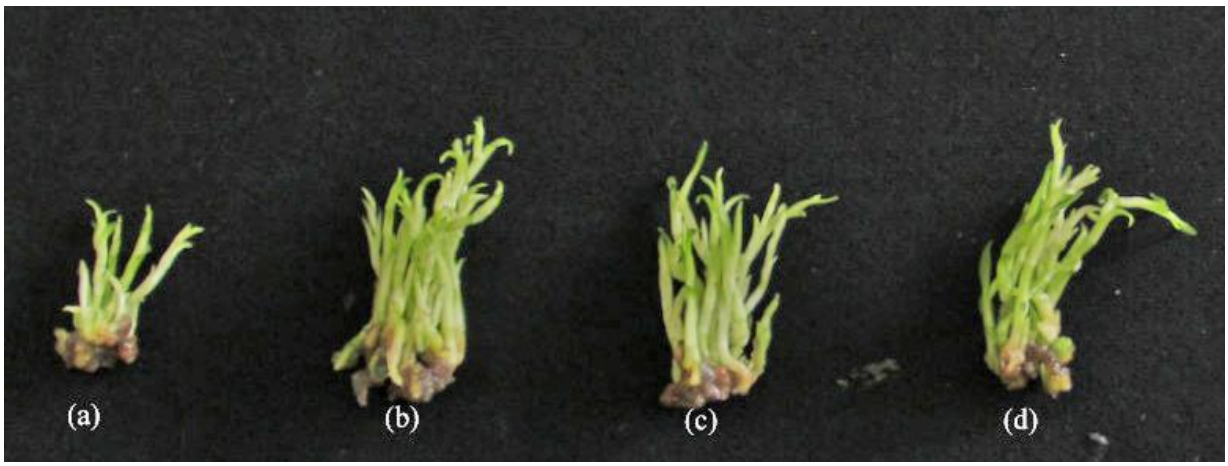
ngày nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung Kin ở các thang nồng độ 0; 0.5; 1.0 và 1.5 mg/l được thể hiện ở bảng 3.28.

Bảng 3.28. Ảnh hưởng của Kin đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro* Hạc đính bảo lộc.

Kin (mg/l)	Số chồi/cụm	Chiều cao chồi (cm)
0	9.58^{d}	1.48^{b*}
0.5	**17.85^{a}**	**1.75^{a}**
1.0	15.25^{b}	1.64^{a}
1.5	13.47^{c}	1.44^{b}

*Ghi chú: *: Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Qua bảng 3.28 cho thấy, môi trường đối chứng không bổ sung Kin trung bình số chồi/mẫu cũng như chiều cao chồi đều thấp hơn so với môi trường có bổ sung Kin. Trong thí nghiệm này thì nghiệm thức bổ sung 0.5 mg/l Kin thích hợp nhất cho sự hình thành và phát triển chồi *in vitro*, chiều cao chồi trung bình của Hạc đính bảo lộc đạt 1.75 cm với 17.85 chồi/cụm (Hình 3.33b). Tuy nhiên, khi nồng độ Kin tăng thì số chồi tạo thành có xu hướng giảm đi, điều đó chứng tỏ ở nồng độ Kin cao đã ức chế sự hình thành chồi mới cũng như chiều cao chồi. Theo Babu và cs. (2003) môi trường có nồng độ cytokinin cao làm cho số chồi giảm, khả năng hình thành cụm chồi kém. Điều này cũng phù hợp với nhận định của Rayle và cs. (1982) là cytokinin ngăn cản sự kéo dài trong thân.



Hình 3.33. Ảnh hưởng của Kin đến sự hình thành và phát triển của chồi cây *in vitro* Hạc đính bảo lộc lần lượt ở các nồng độ 0; 0.5; 1.0; 1.5 mg/l.

- Ảnh hưởng của BA kết hợp với Kin lên sự tái sinh chồi Hạc đính nâu

Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành bổ sung BA ở các nồng độ (0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 mg/l) và Kin (1.0 mg/l) vào môi trường nuôi cấy MS để tìm ra môi trường thích hợp cho sự hình thành và phát triển chồi Hạc đính nâu. Sau 60 ngày

nuôi cấy, khả năng hình thành và phát triển chồi Hạc đính nâu được thể hiện ở bảng 3.29.

Bảng 3.29. Ảnh hưởng của hàm lượng BA kết hợp Kin đến sự hình thành và phát triển chồi Hạc đính nâu.

BA (mg/l)	Kin (mg/l)	Số chồi/cụm	Chiều cao chồi (cm)
0	0	10.18^{d}	1.45^{d*}
0.5	1.0	17.56^{c}	1.65^{c}
1.0	**1.0**	**23.96^{a}**	**2.12^{a}**
1.5	1.0	19.70^{b}	1.80^{b}
2.0	1.0	18.20^{c}	1.55^{cd}

*Ghi chú: *: Những chữ cái khác nhau (a, b, c…) trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Kết quả bảng 3.29 cho thấy, sự hình thành và sinh trưởng chồi cây Hạc đính nâu tăng lên khi bổ sung 1 mg/l Kin kết hợp BA nồng độ từ 0 đến 1.0 mg/l vào môi trường nuôi cấy, số chồi/cụm tăng từ 10.18 chồi/cụm đến 23.96 chồi/cụm; chiều cao chồi tăng từ 1.45 cm đến 2.12 cm. Đặc biệt tối ưu trên môi trường bổ sung 1.0 mg/l Kin kết hợp 1.0 mg/l BA, chiều cao chồi đạt 2.12 cm với 23.96 chồi/cụm (Hình 3.34). Khi nồng độ BA tăng lên từ 1.5 tới 2.0 mg/l thì sự hình thành và sinh trưởng của chồi cây giảm xuống, chiều cao chồi giảm xuống còn 1.80 cm và 1.55 cm với 19.70 và 18.20 chồi/mẫu. Điều này cho thấy, khi sử dụng 1 mg/l Kin kết hợp nồng độ BA từ 0 - 1.0 mg/l có tác dụng thúc đẩy các protocorms phát triển thành chồi cây, nhưng khi nồng độ BA tăng trên 1.5 mg/l sẽ có tác dụng kìm hãm sự hình thành chồi, chồi phát triển không đồng đều. Tuy nhiên, theo Sultana và cs. (2012) nghiên cứu nhân giống loài *Phaius tankervilleae* cho kết quả sử dụng 0.5 mg/l BA cho chiều cao chồi cao nhất đạt 4.5 cm và sử dụng 1.5 mg/l BA thì cho số lượng chồi cao nhất là 16.8.

Hình 3.34. Ảnh hưởng của BA kết hợp Kin đến sự hình thành và phát triển chồi Hạc đính nâu ở nghiệm thức 1.0 mg/l BA + 1.0 mg/l Kin.

- Ảnh hưởng của dịch nghiền củ quả lên sự tái sinh chồi Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu

Trong thí nghiệm này chúng tôi tiến hành cấy vào mỗi bình thí nghiệm 3 cụm chồi có chiều cao 6 mm nuôi cấy trên nền môi trường MS có bổ sung các dịch nghiền (khoai tây, chuối, cà rốt) qua đó xác định được ảnh hưởng của các chất bổ sung này đến sự hình thành và sinh trưởng chồi. Kết quả theo dõi sau 60 ngày được thể hiện ở bảng 3.30.

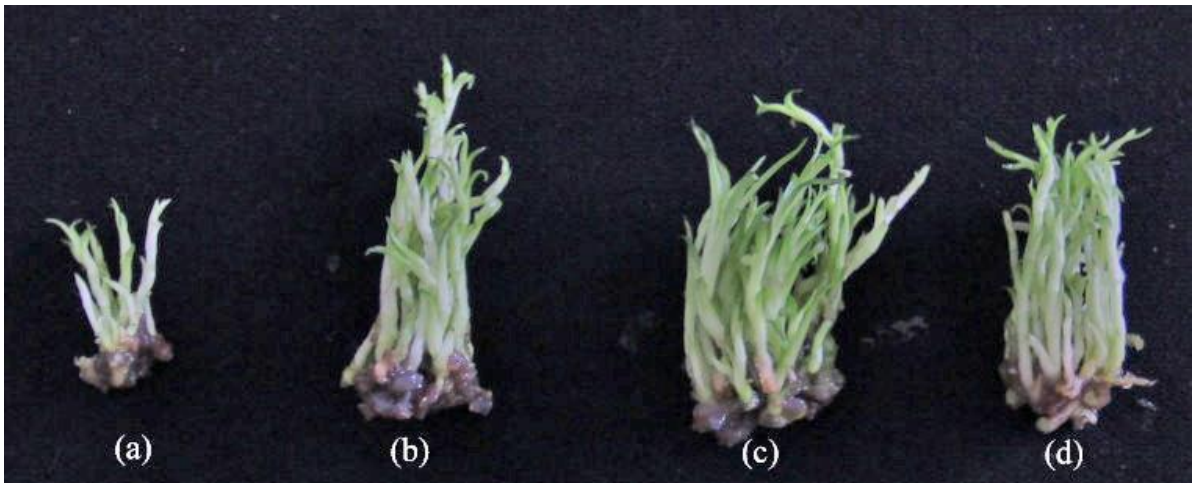
Bảng 3.30. Ảnh hưởng của hàm lượng dịch nghiền củ, quả đến sự hình thành và phát triển chồi Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu.

Loài / Nghiệm thức	Hạc đính bảo lộc		Hạc đính nâu	
	Số chồi/ cụm	**Chiều cao chồi (cm)**	**Số chồi/ cụm**	**Chiều cao chồi (cm)**
Đối chứng	9.58^{d}	1.48^{d*}	10.18^{d}	1.45^{c}
100 g khoai tây/l môi trường	19.56^{b}	1.92^{b}	21.51^{b}	1.85^{b}
100 g chuối chín/l môi trường	**25.22^{a}**	**2.61^{a}**	**26.18^{a}**	**2.77^{a}**
100 g cà rốt/l môi trường	17.87^{c}	1.68^{c}	18.62^{c}	1.75^{b}

*Ghi chú: *: Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu thị sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0.05 trong Ducan's test.*

Kết quả thu được ở bảng 3.30 cho thấy, đối với môi trường bổ sung dịch nghiền hữu cơ thì sự hình thành và phát triển chồi cây tốt hơn môi trường đối chứng (không bổ sung dịch nghiền). So sánh sự sinh trưởng của chồi ở môi trường có bổ sung các dịch nghiền ta thấy dịch nghiền chuối có tác động tốt hơn đến sự

sinh trưởng, phát triển của chồi cây so với 2 dịch nghiền còn lại. Ở cả hai loài, nghiệm thức bổ sung vào môi trường nuôi cấy 100 g chuối chín/l môi trường cho số chồi/cụm và chiều cao chồi cao nhất, 25.22 chồi/cụm và 2.61 cm/chồi đối với loài Hạc đính bảo lộc (Hình 3.35c); 26.18 chồi/cụm và 2.77 cm/chồi đối với Hạc đính nâu (Hình 3.36). Nghiệm thức bổ sung 100 g khoai tây/l môi trường cho số chồi/cụm cũng như chiều cao chồi cao hơn nghiệm thức bổ sung 100 g cà rốt/l môi trường. Dịch nghiền khoai tây có chứa cacbonhydrat dưới dạng saccaroza, glucose và fructose, aminoaxit, các muối khoáng (K, Fe, Mg…) và đặc biệt là các vitamin (C, B1, B6) nên thường được bổ sung vào môi trường vi nhân giống hoa lan (Sutter và Langhans, 1979). Dịch nghiền cà rốt khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy làm gia tăng nguồn dinh dưỡng vì chứa hàm lượng đường cao và các vitamin. Còn dịch nghiền chuối chín có rất nhiều thành phần chứa các hợp chất quan trọng về mặt sinh lý như serotinin, norepinephrine, dopamin và một số catecholamine chưa xác định. Việc bổ sung dịch nghiền chuối vào môi trường nuôi cấy hoa lan thường kích thích sự sinh trưởng bởi nó có tác dụng ổn định pH của môi trường và chứa hợp chất có hoạt tính cytokinin tự nhiên (Zimmerman và Broome, 1981). Puangpaka và cs. (2001) cũng sử dụng 100 g chuối/l môi trường trong nhân nhanh chồi khi nghiên cứu loài *Phaius tankervilliae*. Trong các nghiên cứu của các tác giả khác khi nghiên cứu nhân giống lan cũng cho thấy hiệu quả khi sử dụng chuối trong giai đoạn nhân nhanh chồi như Nguyễn Thị Sơn và cs. (2014) bổ sung 60 g chuối chín/l môi trường khi nhân nhanh cụm chồi lan *Dendrobium officinale*. Shu và cs. (2004) đã công bố môi trường nhân nhanh chồi trên cây lan dược liệu *D. tosaense* là môi trường có bổ sung 8% dịch nghiền chuối.



Hình 3.35. Ảnh hưởng của hàm lượng dịch nghiền củ, quả đến sự hình thành và phát triển chồi Hạc đính bảo lộc. (a) ĐC; (b) 100 g khoai tây/l môi trường; (c) 100 g chuối/l môi trường; (d)100 g cà rốt/l môi trường.

Hình 3.36. Ảnh hưởng của dịch nghiền củ, quả đến sự hình thành và phát triển chồi Hạc đính nâu ở nghiệm thức 100 g chuối/l môi trường.

Như vậy, môi trường MS bổ sung 100 g chuối chín/l môi trường là môi trường nhân nhanh cụm chồi 2 loài Hạc đính.

c. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng (IBA, NAA, IAA) đến khả năng tái sinh rễ Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu

Chồi được tách riêng rẽ, đồng đều về chiều cao và cấy trên môi trường ½MS bổ sung độc lập các chất kích thích sinh trưởng IBA, NAA và IAA ở nồng độ 0.3; 0.5; 1.0 mg/l, khả năng tái sinh rễ của chồi Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu sau 60 ngày nuôi cấy thể hiện trên bảng 3.31.

Bảng 3.31. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng (IBA, NAA, IAA) đến khả năng tái sinh rễ Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu.

Nghiệm thức / Loài			Hạc đính bảo lộc			Hạc đính nâu		
IBA (mg/l)	**NAA (mg/l)**	**IAA (mg/l)**	**Tỷ lệ chồi ra rễ (%)**	**Số rễ/ chồi**	**Chiều dài rễ (cm)**	**Tỷ lệ chồi ra rễ (%)**	**Số rễ/ chồi**	**Chiều dài rễ (cm)**
0	0	0	26.67	2.42^{g}	0.67^{f*}	28.89	3.00^{e}	0.83^{g}
0.3	0	0	42.22	3.07^{f}	2.23^{d}	42.22	4.47^{d}	1.53^{f}
0.5	0	0	50.00	4.56^{de}	2.77^{c}	62.22	5.47^{c}	1.90^{e}
1.0	0	0	42.22	4.20^{e}	2.00^{de}	50.00	4.00^{d}	1.61^{f}

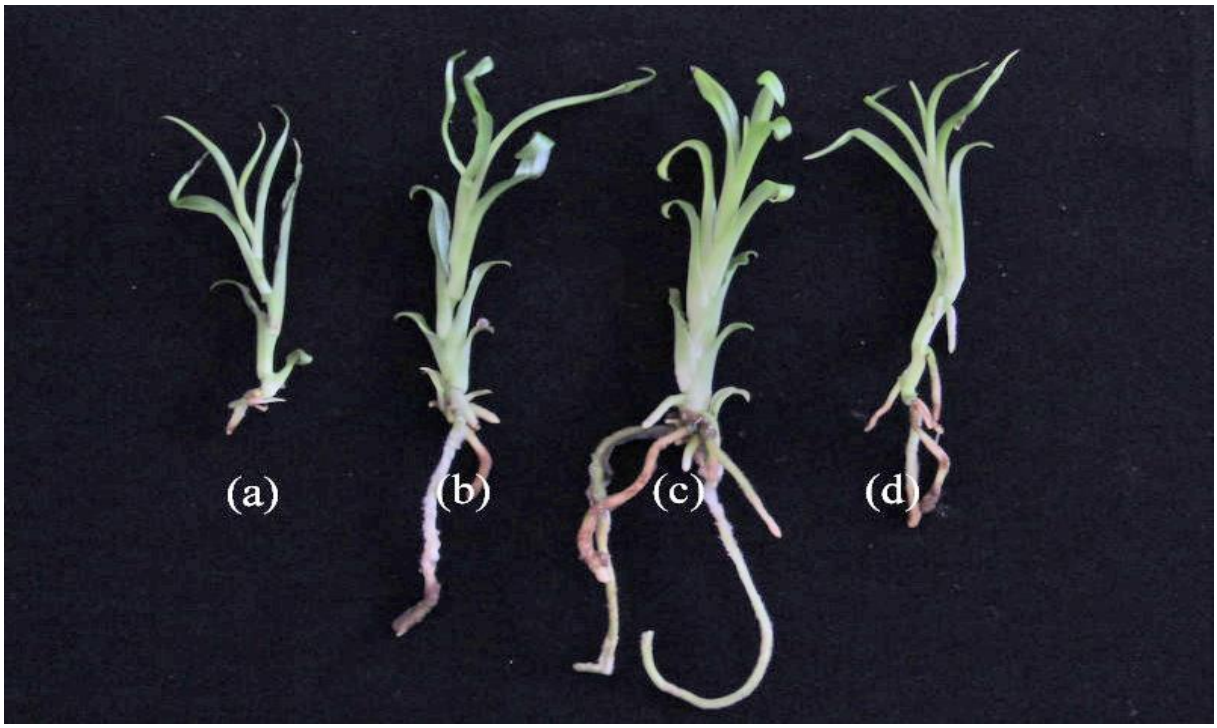
0	0.3	0	80.00	5.47^{c}	3.47^{b}	68.90	5.60^{c}	2.71^{bc}
0	**0.5**	**0**	**93.33**	**6.70^{a}**	**4.20^{a}**	**90.00**	**7.47^{a}**	**4.00^{a}**
0	1.0	0	78.89	6.22^{b}	3.23^{b}	70.00	5.67^{ab}	2.38^{d}
0	0	0.3	49.00	5.56^{c}	1.83^{e}	53.33	5.27^{c}	2.51^{cd}
0	0	0.5	64.45	5.27^{c}	2.17^{de}	66.67	6.34^{b}	2.85^{b}
0	0	1.0	50.00	4.90^{cd}	1.97^{de}	62.22	5.80^{ab}	2.31^{d}

*Ghi chú: *: Những chữ cái khác nhau (a, b, c…) trong cùng một cột chỉ sự khác nhau có ý nghĩa với α = 0,05 trong Ducan's test.*

Kết quả bảng 3.31 cho thấy các chồi đều ra rễ nhưng tỷ lệ ra rễ rất khác nhau giữa nghiệm thức có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng với nghiệm thức đối chứng. Khi bổ sung chất điều hòa 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.

Đối với loài Hạc đính bảo lộc, ở nghiệm thức đối chứng tỷ lệ chồi ra rễ thấp chỉ đạt 26.67%, số rễ trung bình/chồi là 2.42 và chiều dài rễ trung bình chỉ đạt 0.67 cm, rễ mảnh, yếu, lá màu xanh nhạt. Khi bổ sung IBA ở các nồng độ 0.3; 0.5; 1.0 g/l thì tỷ lệ chồi ra rễ tăng từ 42.22% đến 50.00%, số rễ trung bình/chồi lần lượt là 3.07; 4.56; 4.20, chiều dài rễ lần lượt là 2.23 cm; 2.77 cm; 2.00 cm. Trong môi trường nuôi cấy bổ sung IAA có tỷ lệ ra rễ và số rễ/chồi cao hơn môi trường bổ sung IBA, lần lượt ở các nồng độ 0.3; 0.5; 1.0 mg/l là 49.00%; 64.45%; 50.00% và 5.56; 5.27; 4.90 rễ/chồi. Tuy nhiên ở các nghiệm thức bổ sung IAA thì chiều dài rễ thấp hơn so với nghiệm thức bổ sung IBA, chiều dài rễ đạt được ở các nồng độ 0.3; 0.5; 1.0 mg/l lần lượt là 1.83 cm; 2.17 cm; 1.97 cm.

Đặc biệt khả năng tái sinh rễ thích hợp nhất khi bổ sung NAA, đây là chất kích thích sinh trưởng phù hợp cho sự ra rễ của cả hai loài. Đối với Hạc đính bảo lộc, khi bổ sung 0.3 mg/l NAA tỷ lệ ra rễ là 80.00%, trung bình 5.47 rễ/chồi và chiều dài rễ là 3.47 cm. Tối ưu là nghiệm thức bổ sung 0.5 mg/l NAA với tỷ lệ ra rễ 93.33%, số lượng rễ đạt 6.70 rễ/chồi, chiều dài rễ là 4.20 cm, rễ khỏe. Khi tăng nồng độ NAA lên 1.0 mg/l thì các chỉ tiêu theo dõi giảm chỉ còn 78.89% chồi ra rễ, 6.22 rễ/chồi và chiều dài rễ 3.23 cm.



Hình 3.37. Sự hình thành rễ của chồi Hạc đính bảo lộc ở các nồng độ khác nhau. (a). ĐC; (b). 0.5 mg/l IBA; (c). 0.5 mg/l NAA; (d). 0.5 mg/l IAA.

Đối với Hạc đính nâu, khi bổ sung IBA vào môi trường nuôi cấy, nghiệm thức bổ sung 0.5 mg/l IBA cho số rễ cao nhất đạt 5.47 rễ/chồi, chiều dài rễ là 1.90 cm với 62.22% chồi ra rễ tuy nhiên rễ mảnh, yếu. Các nghiệm thức bổ sung IAA cho tỷ lệ ra rễ, số rễ và chiều dài rễ thấp hơn so với IBA và NAA khi cùng nồng độ. Ở các nghiệm thức bổ sung 0.3; 0.5; 1.0 mg/l NAA cho tỷ lệ ra rễ lần lượt là 68.90%; 90.00%; 70.00%; đặc biệt nghiệm thức bổ sung 0.5 mg/l NAA là tối ưu với tỷ lệ ra rễ 90.00%, số lượng rễ đạt 7.47 rễ/chồi, chiều dài rễ là 4.00 cm, rễ khỏe với nhiều rễ phụ. Trên thế giới những nghiên cứu về chi *Phaius* còn rất ít, chủ yếu nghiên cứu về loài *Phaius tankervilleae*, kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Bijaya và Sumitra (2011) khi nghiên cứu nhân giống *Phaius tankervilleae* thông qua chồi đỉnh cho kết quả nồng độ thích hợp cho sự tái sinh rễ là 0.5 mg/l NAA với số lượng rễ là 4.25 ± 0.45.

Hình 3.38. Ảnh hưởng của IAA, IBA và NAA đến khả năng tái sinh rễ Hạc đính nâu. (a). ĐC; (b). 0.5 mg/l IAA; (c). 0.5 mg/l NAA; (d). 0.5 mg/l IBA.

Như vậy, môi trường ½MS bổ sung 0.5 mg/l NAA thích hợp cho sự tái sinh rễ của Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu.

3.3. Quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau ống nghiệm và các biện pháp chăm sóc cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã, tán rừng tự nhiên.

3.3.1. Một số yếu tố ảnh hưởng tới sự sinh trưởng và phát triển của cây con sau ống nghiệm

Đưa cây ra ngoài vườn ươm là giai đoạn quan trọng bao gồm việc tạo rễ, huấn luyện cây thích nghi với thay đổi của nhiệt độ, độ ẩm, sự mất nước, sâu bệnh và chuyển từ trạng thái dị dưỡng sang tự dưỡng hoàn toàn. Đây là giai đoạn quyết định khả năng ứng dụng quy trình nhân giống *in vitro*. Cây con *in vitro* được nuôi cấy trong điều kiện nhân tạo, được cung cấp đầy đủ chất dinh dưỡng và có môi trường sống lý tưởng nhưng khi đưa ra môi trường tự nhiên, các yếu tố dinh dưỡng và môi trường đều thay đổi đột ngột. Vì vậy việc tìm ra chế độ chăm sóc, chế độ dinh dưỡng phù hợp cho cây sinh trưởng nhanh, khỏe mạnh, có tỷ lệ sống sót cao khi ở vườn ươm là rất cần thiết đảm bảo xây dựng được việc nhân giống hoàn chỉnh. Mỗi loài cây có một môi trường phù hợp riêng cho sự sinh trưởng, phát triển (Đỗ Năng Vịnh, 2002). Trên thực tế, đây là giai đoạn rất quan trọng có ảnh hưởng quyết định đến hiệu suất của toàn bộ quá trình nuôi cấy. Đối với lan, việc chăm sóc cây con bằng phương pháp nhân giống truyền thống đã rất khó, việc chăm sóc cây con *in vitro* còn khó hơn nhiều. Vì vậy chúng tôi tiến hành các thí nghiệm khảo sát giá thể, chế độ dinh dưỡng cũng như ảnh hưởng của một số nhân

tố sinh thái trong giai đoạn đưa cây lan ra vườn ươm nhằm mục đích tìm ra điều kiện thích hợp, đảm bảo tỷ lệ sống cao của cây con.

3.3.1.1. Hoàng thảo trần kim và Hoàng thảo dẹt

a. Ảnh hưởng của các loại giá thể

Giá thể trồng hoa lan rất quan trọng, liên quan đến suốt quá trình sinh trưởng và phát triển của cây. Các loại giá thể được biết đến bao gồm than củi, xơ dừa, gỗ, than, dớn mút, rêu, rễ bèo, dương xỉ... (Việt Chương và Nguyễn Việt Thái, 2002) nhưng đối với mỗi đối tượng khác nhau thì giá thể phù hợp để cây có tỷ lệ sống cao, sinh trưởng và phát triển tốt là khác nhau. Trước khi trồng cây lan con được lấy ra từ bình nuôi cấy, rửa sạch, giai đoạn này cũng ảnh hưởng rất lớn đến tỷ lệ sống của chúng. Dùng nước máy đã để bốc hết hơi Clo, pH: 5.2 đựng trong một chậu sạch, trong nước đã pha một nồng độ thật loãng thuốc ngừa nấm như Methan. Lấy chai cấy đựng lan con, sau khi gỡ bông gòn ra khỏi cổ chai cho một ít nước vào chai lắc nhẹ, dùng que tách cây con ra khỏi môi trường thạch, lật ngược chai lại các cây lan con theo nước chạy vào chậu đựng nước. Dùng kẹp gắp giữ lan con và rửa sạch thạch dính vào bộ rễ qua động tác đưa qua đưa lại nhiều lần trong nước, cắt bỏ toàn bộ rễ hư thối và bị dập, đặt lan vào một rổ sạch cho ráo nước.

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng 4 loại giá thể đó là bột xơ dừa, đất sạch Eco, dớn mút và trấu hun phối trộn đất sạch Eco (1:1). Kết quả thu được sau 60 ngày đưa cây ra vườn ươm được thể hiện trong bảng 3.32.

Bảng 3.32. Ảnh hưởng của giá thể tới cây lan Hoàng thảo trần kim và Hoàng thảo dẹt trong giai đoạn vườn ươm.

Giá thể	Hoàng thảo trần kim			Hoàng thảo dẹt		
	Số rễ	**Chiều dài rễ (cm)**	**Tỷ lệ sống (%)**	**Số rễ**	**Chiều dài rễ (cm)**	**Tỷ lệ sống (%)**
Đất sạch Eco	5.00	4.00	81.62	5.27	4.67	81.87
Bột xơ dừa	4.00	3.50	62.09	4.00	3.37	64.06
Dớn mút	**8.00**	**5.50**	**93.29**	**8.27**	**5.73**	**94.10**
Trấu hun phối trộn đất sạch Eco (1:1)	3.50	3.70	78.23	3.73	3.77	74.41
LSD 5%	0.49	0.20		0.30	0.26	
CV%	4.90	2.50		2.80	3.00	

Qua kết quả bảng 3.32 nhận thấy, ở tất cả các giá thể khác nhau cho thấy sự phân hóa rõ về tỷ lệ sống và đặc điểm phát triển của cây con. Tuy nhiên, các nghiệm thức đều có cây con bị chết, nguyên nhân chết là do cây mới đưa ra khỏi

bình nuôi cấy, chúng phải trải qua giai đoạn thích nghi, bộ rễ chưa ổn định nên dễ bị tổn thương và bị chết.

Kết quả ở bảng 3.32 cho thấy với những giá thể khác nhau thì phản ứng của cây cũng khác nhau. Tỷ lệ sống thấp nhất là giá thể bột xơ dừa, chỉ đạt 62.09% và 64.06% lần lượt đối với Hoàng thảo trần kim và Hoàng thảo dẹt, không có nhiều rễ mới và sức sống cây kém. Như vậy, giá thể bột xơ dừa không phù hợp ở giai đoạn này. Trong khi đó, ở giá thể trấu hun phối trộn đất sạch Eco (1:1) có tỷ lệ sống cao hơn giá thể bột xơ dừa, nhưng cây con vẫn khá yếu và ít có rễ mới, giá thể này chưa thật sự phù hợp cho sự phát triển của cây con. Bên cạnh đó, cây con trồng trên giá thể đất sạch Eco có sự xuất hiện của rễ mới và tỷ lệ sống đạt trên 80.00%, cây sinh trưởng và phát triển khá tốt nhưng vẫn thấp hơn so với cây con trồng trên giá thể dớn mút, cả 2 loài Hoàng thảo trần kim và Hoàng thảo dẹt giá thể dớn mút cho tỷ lệ sống cao nhất (93.29% và 94.10%), số rễ nhiều nhất (8.00 rễ/cây và 8.27 rễ/cây) và chiều dài rễ đạt 5.50 cm và 5.73 cm.

Việc chăm sóc cây con ở giai đoạn vườn ươm rất quan trọng cho sự thành công trong nuôi cấy mô. Một loạt các phương pháp nghiên cứu trong giai đoạn *in vitro*, chẳng hạn như các môi trường nuôi cấy *in vitro* khác nhau, nồng độ agar và sucrose trong môi trường, các chất kích thích tăng trưởng được sử dụng có thể đã làm giảm sự thích nghi của cây ở giai đoạn vườn ươm. Vì thế, việc lựa chọn đúng giá thể có thể giảm tỷ lệ chết của cây con trong quá trình thích nghi vườn ươm (Deb và Imchen, 2010). Sunitibala và Rajkumar (2009) đã chuyển cây *D. transparens* trong hỗn hợp giá thể gồm gạch và than theo tỷ lệ 2:1 đạt tỷ lệ sống sót là 90%. Nguyễn Thanh Tùng và cs. (2010) khi trồng loài *D. aduncum* trong hỗn hợp bầu chứa rêu sphagnum và dương xỉ theo tỷ lệ 1:1 có tỷ lệ sống đạt 90% và hình thành nhiều rễ mới. Các kết quả này khác với kết quả của chúng tôi, có thể thấy tuy cùng chi nhưng mỗi loài khác nhau sẽ thích hợp với các giá thể trồng khác nhau.

Như vậy, giá thể dớn mút là giá thể thích hợp để trồng cây Hoàng thảo trần kim và Hoàng thảo dẹt ngoài vườn ươm.

Hình 3.39. Ảnh hưởng của giá thể tới Hoàng thảo trần kim *in vitro* trong giai đoạn vườn ươm. (a). Đất sạch Eco; (b). Bột xơ dừa; (c). Dớn mút; (d). Trấu hun phối trộn đất sạch Eco (1:1).

Hình 3.40. Hoàng thảo dẹt trồng trên giá thể dớn mút.

Bên cạnh giá thể thích hợp thì dinh dưỡng cũng là một trong các yếu tố quan trọng quyết định đến tốc độ sinh trưởng và phát triển của cây lan. Cây lan rất cần phân bón nhưng không cần nồng độ cao. Vì vậy, việc bón phân cho cây lan phải thực hiện thường xuyên và tốt nhất là bằng cách phun qua lá (Dương Đức Huyến, 2007). Ở mỗi loài khác nhau sẽ có những nhu cầu khác nhau về dinh dưỡng, vì thế việc tìm hiểu ảnh hưởng của các loại dinh dưỡng qua lá đến khả năng sinh trưởng, phát triển của cây Hoàng thảo trần kim và Hoàng thảo dẹt là việc quan trọng nhằm xác định loại dinh dưỡng tốt nhất cho sự sinh trưởng và phát triển của cây. Vì thế chúng tôi tiến hành thí nghiệm tiếp theo.

b. Ảnh hưởng của các loại phân bón

- Loài Hoàng thảo trần kim

Trong thí nghiệm này chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của phân bón lá Antonik, Growmore Humic acid 322 và Yogen N02 đến sự phát triển của cây thông qua chiều cao và số lá của cây để so sánh sự khác biệt. Kết quả theo dõi sau 60 ngày được thể hiện trong bảng 3.33.

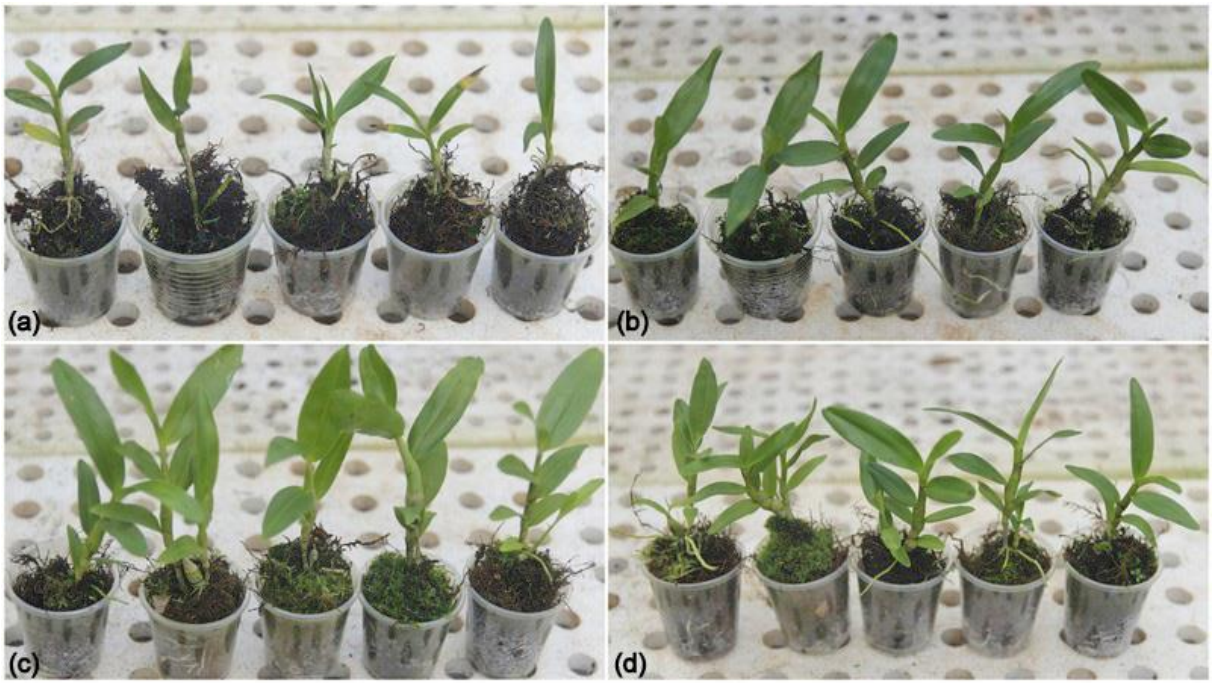
Bảng 3.33. Ảnh hưởng của các loại phân bón lá tới cây Hoàng thảo trần kim *in vitro* trong giai đoạn vườn ươm.

Loại phân	Chiều cao cây (cm)	Số lá của cây
Không sử dụng phân bón lá	4.80	4.00
Antonik (1 ml/l)	6.80	5.20
Growmore Humic acid 322 (1 ml/l)	**7.93**	**7.00**
Yogen N02 (1 ml/l)	7.40	5.80
LSD 5%	0.22	0.30
CV%	1.70	2.80

Ghi chú: ***- Antonik:*** *Sodium - S - Nitrogualacolate 0.03 + Sodium - O - Nitrophenolate 0.06 % + Sodium - P - Nitrophenolate 0.09 %.*
- Growmore Humic: *N: 3%, P_2O_5: 2%, K_2O: 2%, Humic Acid 6.3%; Fulvic Acid 1.2%; Fe, Cu, Mn…*
- Yogen N02: *N: 30%; P_2O_5: 10%; K_2O: 10%.*

Qua kết quả ở bảng 3.33 chúng tôi nhận thấy sự khác biệt rõ ràng khi sử dụng phân bón lá và không sử dụng phân bón lá. Trong nghiệm thức đầu tiên không sử dụng phân bón lá cây chậm phát triển hơn, chiều cao cây chỉ đạt trung bình 4.80 cm và số lá trung bình là 4.00 lá, lá nhỏ và có dấu hiệu vàng lá (Hình 3.41a). Các loại chế phẩm dinh dưỡng (phân bón lá) đều có ảnh hưởng tốt đến chiều cao cây và số lá, ở mức sai khác tin cậy 95%. Antonik là một hợp chất nitro thơm và các chất điều tiết sinh trưởng, trong thí nghiệm này khi sử dụng Antonik chiều cao cây chỉ đạt trung bình 6.80 cm và số lá trung bình là 5.20 lá (Hình 3.41b). Bên

cạnh đó, đối với 2 loại phân bón lá Growmore Humic acid 322 và Yogen N02 khi sử dụng cho cây con Hoàng thảo trần kim cho chiều cao cây và số lá trung bình đều cao hơn nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức sử dụng Antonik. Tuy nhiên, ở nghiệm thức sử dụng phân bón lá Growmore Humic acid 322 là thích hợp nhất cho lan Hoàng thảo trần kim với chiều cao cây trung bình đạt được là 7.93 cm và số lá trung bình là 7.00 lá (Hình 3.41c), cao hơn nghiệm thức sử dụng phân bón lá Yogen N02, chiều cao cây trung bình chỉ đạt 7.40 cm và số lá trung bình 5.80 lá, đồng thời kích thích phát triển chồi bên (Hình 3.41d). Growmore Humic acid 322 có chứa các thành phần là Humic Acid, Fulvic Acid, Fe, Cu, Mn… giúp cây tăng sức sống, làm cho lá cây xanh và quang hợp mạnh đồng thời tăng sức đề kháng của cây con chống lại sâu bệnh.



Hình 3.41. Ảnh hưởng của phân bón lá tới cây Hoàng thảo trần kim *in vitro* trong giai đoạn vườn ươm. (a). Không sử dụng phân bón lá; (b). Antonik; (c). Growmore Humic acid 322; (d). Yogen N02.

Như vậy, phun phân bón qua lá Growmore Humic acid 322 là phù hợp nhất đối với Hoàng thảo trần kim ở giai đoạn vườn ươm.

- Loài Hoàng thảo dẹt

Đối với loài Hoàng thảo dẹt chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của phân bón lá Antonik, Komic và Growmore Humic acid 322 đến sự phát triển của cây với các chỉ tiêu theo dõi là chiều cao và số lá của cây để so sánh sự khác biệt. Kết quả sau 60 ngày được thể hiện trong bảng 3.34.

Bảng 3.34. Ảnh hưởng của các loại phân bón lá tới cây Hoàng thảo dẹt *in vitro* trong giai đoạn vườn ươm.

Loại phân	Chiều cao cây (cm)	Số lá của cây
Không sử dụng phân bón lá	4.70	5.20
Antonik (1 ml/l)	6.40	6.34
Komic (1 ml/l)	**8.47**	**8.07**
Growmore Humic acid 322 (1 ml/l)	7.60	7.00
LSD 5%	0.46	0.31
CV%	3.40	2.40

Ghi chú: ***Komic:*** *N: 2.6%; P_2O_5: 7.5%; K_2O: 2.2%; MgO: 800 ppm; Zn: 200 ppm; Mn: 30 ppm; B: 50 ppm; Cu: 100 ppm.*

Qua kết quả ở bảng 3.34 chúng tôi nhận thấy có sự khác biệt rõ ràng khi sử dụng phân bón lá và không sử dụng phân bón lá. Trong nghiệm thức đầu tiên chỉ tưới nước không sử dụng phân bón lá cây chậm phát triển hơn, chiều cao cây chỉ đạt trung bình 4.70 cm và số lá trung bình là 5.20 lá, lá nhỏ và có dấu hiệu vàng lá. Các loại chế phẩm dinh dưỡng (phân bón lá) đều có ảnh hưởng tốt đến chiều cao cây và số lá, ở mức sai khác tin cậy 95%. Antonik là một hợp chất nitro thơm và các chất điều tiết sinh trưởng, trong thí nghiệm này khi sử dụng Antonik chiều cao cây chỉ đạt trung bình 6.40 cm và số lá trung bình là 6.34 lá. Bên cạnh đó, đối với 2 loại phân bón lá Growmore Humic acid 322 và Komic khi sử dụng cho cây con Hoàng thảo dẹt cho chiều cao cây và số lá trung bình đều cao hơn nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức sử dụng Antonik. Tuy nhiên, ở nghiệm thức sử dụng phân bón lá Komic là thích hợp nhất cho lan Hoàng thảo dẹt với chiều cao cây trung bình là 8.47 cm và số lá trung bình là 8.07 lá, cao hơn nghiệm thức sử dụng phân bón lá Growmore Humic acid 322, chiều cao cây trung bình chỉ đạt 7.60 cm và số lá trung bình 7.00 lá, đồng thời kích thích phát triển chồi bên.

Các tác giả Trần Văn Huân, Văn Tích Lượm (2007) cũng chỉ ra các loại phân bón thường sử dụng cho phong lan là Growmore, Komic, phân bón đầu trâu, Dynamic... ngoài ra còn có thể sử dụng nguồn phân hữu cơ sẵn có đã qua ngâm ủ. Tuy nhiên mỗi loài khác nhau thì sẽ thích hợp với các loại phân bón khác nhau.

c. Ảnh hưởng của độ che sáng

Ánh sáng là một trong những nhân tố sinh thái quan trọng có ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng sinh trưởng của cây trồng ở mọi lứa tuổi, mỗi loài cây khác nhau và ở mỗi giai đoạn tuổi khác nhau thì nhu cầu về ánh sáng cũng khác nhau. Vì thế, để đảm bảo tỷ lệ sống sót của cây con cần phải nghiên cứu chế độ ánh sáng thích hợp trong giai đoạn vườn ươm. Chính vì thế chúng tôi tiến hành nghiên cứu

ở các độ che sáng khác nhau để tìm ra được độ che sáng thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cây con Hoàng thảo dẹt và Hoàng thảo trần kim ngoài vườn ươm. Kết quả sau 60 ngày được thể hiện ở bảng 3.35.

Bảng 3.35. Ảnh hưởng của độ che sáng đến sinh trưởng cây con Hoàng thảo dẹt và Hoàng thảo trần kim trong giai đoạn vườn ươm.

Nghiệm thức	Hoàng thảo dẹt			Hoàng thảo trần kim		
	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá
Che sáng 50% - 60%	59.18	4.77	4.27	60.33	4.92	4.27
Che sáng 60% - 70%	**93.87**	**5.63**	**6.00**	**94.67**	**5.77**	**6.20**
Che sáng 70% - 80%	70.51	6.03	5.00	71.67	6.49	5.20
LSD 5%		0.51	0.60		0.17	0.15
CV%		4.20	5.20		1.40	1.30

Qua kết quả bảng 3.35 nhận thấy, chế độ che sáng có ảnh hưởng quan trọng đến sự sinh trưởng của cả 2 loài. Ở ba nghiệm thức tỷ lệ sống của cây con đều đạt trên 50.00%.

Ở nghiệm thức che sáng 50% - 60%, đối với Hoàng thảo dẹt tỷ lệ sống trung bình của cây con là 59.18%, chiều cao cây trung bình là 4.77 cm và số lá trung bình là 4.27 lá. Với Hoàng thảo trần kim tỷ lệ sống trung bình của cây con là 60.33%, chiều cao cây trung bình là 4.92 cm và số lá trung bình là 4.27 lá.

Nghiệm thức che sáng 70% - 80% có tỷ lệ sống trung bình 70.51%, chiều cao cây đạt 6.03 cm, cao hơn hai nghiệm thức còn lại, số lá trung bình là 5.00 lá đối với cây Hoàng thảo dẹt, cây cao tuy nhiên lá lại nhỏ và nhạt màu. Còn ở Hoàng thảo trần kim, nghiệm thức che sáng 70% - 80% cây có tỷ lệ sống, chiều cao cây và số lá trung bình lần lượt là 71.67%, 6.49 cm và 5.20 lá, cây thiếu ánh sáng nên thân cây vươn cao để tìm ánh sáng và lá chỉ có thể tiến hành quang hợp yếu do đó cây rất mảnh.

Nghiệm thức có chế độ che sáng thích hợp nhất cho cả 2 loại cây trong giai đoạn vườn ươm là nghiệm thức che sáng 60% - 70%, tỷ lệ sống trung bình đạt 93.87%, chiều cao cây trung bình 5.63 cm, số lá trung bình 6.00 lá ở Hoàng thảo dẹt và 94.67%, 5.77 cm, 6.20 lá ở Hoàng thảo trần kim, chiều cao cây tuy thấp hơn nghiệm thức che sáng 70% - 80% nhưng trạng thái cây phát triển tốt hơn. Nhờ có mức ánh sáng phù hợp nên cây quang hợp tốt, lá to, có màu xanh đậm.

Như vậy, cường độ che sáng phù hợp của cây con Hoàng thảo dẹt và Hoàng thảo trần kim trong giai đoạn vườn ươm là 60% - 70%.

Hình 3.42. Cây con Hoàng thảo dẹt ở các chế độ che sáng khác nhau. a. che sáng 50% - 60%, b. che sáng 60% - 70%, c. che sáng 70% - 80%.

d. Ảnh hưởng của độ ẩm

Bên cạnh cường độ che sáng thích hợp thì độ ẩm cũng là một trong những yếu tố quan trọng quyết định đến tốc độ sinh trưởng và phát triển của cây con ngoài vườn ươm. Khi có độ ẩm thích hợp cây con sẽ phát triển nhanh hơn và sức đề kháng cao. Trong giai đoạn vườn ươm việc điều khiển số lần tưới phun sương có ý nghĩa rất quan trọng trong việc duy trì độ ẩm với các khoảng độ ẩm thích hợp cho cây con. Mỗi loài lan thì có ẩm độ thích hợp riêng, vì vậy chúng tôi tiếp tục tiến hành thí nghiệm để tìm ra độ ẩm thích hợp cho cây con *in vitro* Hoàng thảo dẹt và Hoàng thảo trần kim thông qua nghiên cứu số lần tưới phun sương trong ngày. Kết quả sau 60 ngày được thể hiện ở bảng 3.36.

Bảng 3.36. Ảnh hưởng của độ ẩm đến sinh trưởng cây con Hoàng thảo dẹt và Hoàng thảo trần kim trong giai đoạn vườn ươm.

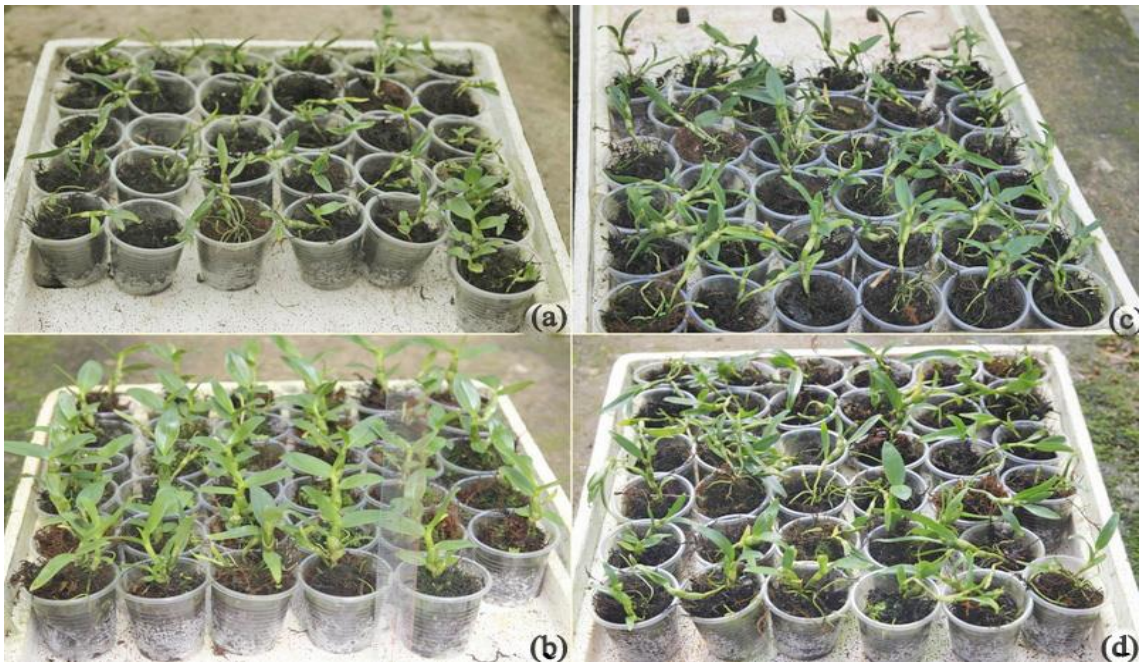
Độ ẩm	Tỷ lệ sống (%)		Trạng thái phát triển của cây
	Hoàng thảo dẹt	Hoàng thảo trần kim	
30% - 40% (Tưới phun sương 1 lần/ngày)	40.80	41.60	Lá hơi vàng, cây còi cọc và kém phát triển.
50% - 60% (Tưới phun sương 2 lần/ngày)	**96.73**	**97.53**	**Lá có màu xanh đậm, cây sinh trưởng tốt.**
70% - 80% (Tưới phun sương 3 lần/ngày)	74.47	74.73	Lá màu xanh nhạt, cây sinh trưởng chậm.
Trên 90% (Tưới phun sương 4 lần/ngày)	49.47	49.07	Lá có dâu hiệu úng nước, cây kém phát triển.
LSD 5%	2.96	1.12	
CV%	2.30	0.90	

Qua kết quả thu được ở bảng 3.36 nhận thấy, tỷ lệ sống sót và trạng thái phát triển của cây ở các khoảng độ ẩm (chế độ nước tưới phun sương) khác nhau là khác nhau. Ở cả hai loài cho kết quả gần tương đương nhau, khoảng độ ẩm từ 30% - 40% (tưới phun sương 1 lần/ngày) cho tỷ lệ sống sót thấp nhất 40.80% và 41.60% lần lượt ở Hoàng thảo dẹt và Hoàng thảo trần kim, do hàm lượng nước ít, độ ẩm thấp so với nhu cầu của cây nên rễ cây tiến hành hô hấp kém, tích lũy các chất gây độc làm cho tế bào lông hút bị chết và không hình thành được lông hút mới. Do đó cây không hấp thu được nước dẫn đến mất cân bằng nước làm cho lá cây hơi vàng, cây còi cọc, kém phát triển héo dần rồi chết.

Khi độ ẩm tăng 50% - 60% (tưới phun sương 2 lần/ngày) cho tỷ lệ cây sống cao nhất đạt 96.73% và 97.53%, cây sinh trưởng rất tốt, lá của cây con có màu xanh đậm, bộ rễ phát triển tốt thuận lợi cho cây con sinh trưởng và phát triển. Trong điều kiện độ ẩm 70% - 80% (tưới phun sương 3 lần/ngày) thì nhận thấy tỷ lệ sống của cây con giảm xuống 74.47% và 74.73%, cây sinh trưởng chậm hơn, lá có màu xanh nhạt.

Khi độ ẩm tăng lên trên 90% (tưới phun sương 4 lần/ngày) thì tỷ lệ sống sót chỉ còn 49.47% và 49.07%, lượng nước cung cấp cho cây và độ ẩm quá cao làm cho cây con có dấu hiệu bị úng dẫn đến cây kém phát triển.

Như vậy, điều kiện độ ẩm 50% - 60% (tưới phun sương 2 lần/ngày) là phù hợp cho cây con Hoàng thảo dẹt và Hoàng thảo trần kim trong giai đoạn vườn ươm với tỷ lệ cây sống sót cao nhất.



Hình 3.43. Cây con Hoàng thảo dẹt ở các độ ẩm khác nhau a. 30% - 40% (tưới phun sương 1 lần/ngày); b. 50% - 60% (tưới phun sương 2 lần/ngày); c. 70% - 80% (Tưới phun sương 3 lần/ngày); d. Trên 90% (Tưới phun sương 4 lần/ngày).

3.3.1.2. Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu

a. Ảnh hưởng của các loại giá thể

Các cây con sau khi trồng được tưới giữ ẩm hàng ngày. Sau khi chuyển cây từ chai mô ra khay ươm thì thấy cây mau chóng ổn định và thích nghi. Chọn cây có chiều cao khoảng 3 - 4 cm, 3 - 5 lá được bố trí vào các giá thể khác nhau. Tỷ lệ cây sống của cây lan con ở giai đoạn ươm này được ghi nhận bằng trung bình 3 lần lặp lại trên các giá thể và kết quả sau 60 ngày được chúng tôi thể hiện ở bảng 3.37.

Bảng 3.37. Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống và hình thái cây con *in vitro* Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu trong giai đoạn vườn ươm.

Giá thể	Tỷ lệ cây sống (%)		Hình thái cây
	Hạc đính bảo lộc	Hạc đính nâu	
Bột xơ dừa: Dớn mút (1:1)	89.16	84.18	Lá xanh đậm, ra rễ mới nhưng chưa nhiều.
Đất sạch Eco	52.20	55.53	Lá xanh nhạt, rễ phát triển chậm.
Dớn mút	**97.69**	**98.38**	**Lá xanh đậm, ra rễ mới, cây phát triển tốt.**
Trấu hun: đất sạch Eco (1:1)	71.82	87.30	Lá xanh, ra rễ ít.

Trong giai đoạn này mặc dù cây không tăng trưởng nhiều về chiều cao và kích thước nhưng cây có sự thay đổi rất rõ: lá từ màu xanh non chuyển sang xanh đậm hơn, thân cây cứng cáp hơn, rễ cũng nhiều hơn hẳn. Qua kết quả thí nghiệm nhận thấy các loại giá thể khác nhau cũng có ảnh hưởng khác nhau đến tỷ lệ sống của cây con. Ở giá thể bột xơ dừa phối trộn với dớn mút tỷ lệ 1:1 sau 60 ngày chăm sóc cây có tỷ lệ sống là 89.16% và 84.18% lần lượt ở Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu, lá xanh đậm, ra rễ mới nhưng chưa nhiều, cây phát triển ổn định. Giá thể đất sạch Eco cây có tỷ lệ sống thấp nhất chỉ đạt 52.20% và 55.53% lần lượt ở Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu, cây con có lá xanh nhạt, rễ phát triển chậm, một phần các rễ cũ thối đen và một số cây có hiện tượng thối cổ rễ. Giá thể trấu hun phối trộn đất sạch Eco tỷ lệ 1:1 cây có tỷ lệ sống cao hơn so với giá thể đất sạch Eco, tỷ lệ sống đạt 71.82% ở Hạc đính bảo lộc và 87.30% ở Hạc đính nâu, thân vẫn cứng cáp không bị thối nhưng ra rễ ít, tuy nhiên cây vẫn phát triển tốt hơn giá thể đất sạch Eco. Đặc biệt ở giá thể dớn mút, cây có tỷ lệ sống cao nhất là 97.69% ở Hạc đính bảo lộc và 98.38% ở Hạc đính nâu, ở giá thể này cây con phát triển tốt nhất với lá xanh đậm và có rễ mới.

Theo các tác giả Somporn và Rosemina (2009) nghiên cứu ảnh hưởng của các giá thể là bột xơ dừa, không giá thể, viên than nhỏ, bột xơ dừa phối trộn viên than nhỏ tỷ lệ 1:1 đến tỷ lệ sống và tăng chiều dài rễ của loài lan *Aerides houlletiana* nuôi cấy mô và tốt nhất là ra cây không cần giá thể cho tỷ lệ sống 84.00%, chiều dài rễ đạt 0.42 cm. Kết quả này khác với thực nghiệm của chúng tôi, sự khác nhau này có thể do mỗi đối tượng khác nhau thì phù hợp với các giá thể khác nhau.

Như vậy, giá thể dớn mút là thích hợp cho cây lan con Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu nuôi cấy mô tại vườn ươm.

Hình 3.44. Cây con Hạc đính bảo lộc trồng trên giá thể dớn mút.

Hình 3.45. Cây con Hạc đính nâu trồng trên giá thể dớn mút.

b. Ảnh hưởng của các loại phân bón

Chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm trước và tìm được giá thể phù hợp với cây con ngoài vườn ươm là dớn mút cho cây có tỷ lệ sống cao. Tuy nhiên, phải kể đến yếu tố dinh dưỡng, bởi dinh dưỡng đóng vai trò quan trọng trong việc sinh trưởng phát triển thân lá, mỗi loại lan và mỗi giai đoạn sinh trưởng của cây yêu cầu một chế độ dinh dưỡng, một lượng phân bón khác nhau. Chính vì vậy, việc nghiên cứu xác định loại phân thích hợp giúp cây sinh trưởng và phát triển khỏe mạnh, nâng cao chất lượng cho lan là rất cần thiết. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số loại phân bón tới sinh trưởng, phát triển của cây lan con Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu sau 60 ngày được thể hiện ở bảng 3.38.

Bảng 3.38. Ảnh hưởng của các loại phân bón đến tỷ lệ sống và phát triển cây con Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu trong giai đoạn vườn ươm.

Phân bón	Hạc đính bảo lộc		Hạc đính nâu		Hình thái cây
	Chiều cao cây (cm)	Số lá	Chiều cao cây (cm)	Số lá	
ĐC	9.70	3.47	10.08	3.70	Cây phát triển yếu, lá mảnh, hơi vàng.
Yogen N02	13.00	4.53	12.37	4.80	Cây phát triển khá chậm, lá nhỏ, mảnh.
Đạm cá	**15.10**	**5.73**	15.10	6.06	Cây phát triển bình thường, lá xanh nhạt.
Nitrophoska Foliar	13.80	5.53	**15.80**	**6.87**	Cây phát triển tốt, cứng cáp, lá nhiều, xanh đậm, dày.
LSD 5%	0.45	1.10	0.73	0.90	
CV%	1.80	11.30	2.80	8.40	

Ghi chú: Nitrophoska Foliar 20-20-20.

Qua bảng 3.38 cho thấy các loại phân bón khác nhau đều có ảnh hưởng nhất định đến cây con ngoài vườn ươm. Về chỉ tiêu chiều cao cây: các loại chế phẩm dinh dưỡng đều có ảnh hưởng tốt đến động thái tăng chiều cao cây, ở mức độ sai khác tin cậy 95% chế phẩm dinh dưỡng tốt nhất là Nitrophoska Foliar đối với Hạc đính nâu, cây được phun Nitrophoska Foliar đạt chiều cao trung bình là 15.80 cm trong khi cây được phun các loại dinh dưỡng khác thì thấp hơn. Khi sử dụng đạm cá chiều cao cây đạt trung bình là 15.10 cm, cao hơn khi sử dụng Yogen N02, chiều cao cây chỉ đạt 12.37 cm và thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng không sử dụng các loại phân bón dinh dưỡng, chiều cao cây chỉ đạt trung bình 10.08 cm. Về chỉ tiêu số lá khi phun Nitrophoska Foliar cũng cho số lá trung bình cao nhất

6.87 lá/cây, tiếp theo là khi sử dụng đạm cá và Yogen N02, số lá thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng chỉ có trung bình 3.70 lá/cây.

Đối với Hạc đính bảo lộc thì chế phẩm dinh dưỡng tốt nhất là đạm cá, cây được phun đạm cá đạt chiều cao trung bình là 15.10 cm trong khi cây được bơm các loại dinh dưỡng khác thì thấp hơn. Khi sử dụng Nitrophoska Foliar chiều cao cây đạt trung bình là 13.80 cm, cao hơn khi sử dụng Yogen N02, chỉ đạt trung bình là 13.00 cm và thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng, chiều cao cây chỉ đạt trung bình 9.70 cm. Về chỉ tiêu số lá khi phun đạm cá cũng cho số lá trung bình cao nhất 5.73 lá/cây, tiếp theo là khi sử dụng Nitrophoska Foliar.

Vũ Ngọc Lan và cs. (2011) khi nghiên cứu ảnh hưởng của dinh dưỡng qua lá đến sinh trưởng và phát triển của lan Hoàng thảo dẹt đạt được kết quả là sử dụng dinh dưỡng Antonik tỏ ra có ưu thế với cây lan cả về động thái gia tăng chiều cao cây, đường kính thân và tăng số lá. Còn theo Lê Thanh Nhuận và cs. (2009) thì cho rằng phân bón chậm tan loại N-P-K = 20-20-20 và phân bón lá Growmore cho lan *Dendrobium* lai ở giai đoạn vườn ươm là phù hợp. Có thể thấy mỗi loài lan khác nhau sẽ thích hợp với các loại phân bón dinh dưỡng khác nhau.

Như vậy, nghiệm thức phun đạm cá đối với Hạc đính bảo lộc và Nitrophoska Foliar đối với Hạc đính nâu là thích hợp nhất cho cây lan con ở vườn ươm, cây cứng cáp khỏe mạnh, lá nhiều và dày, có màu xanh đậm.

Hình 3.46. Cây con Hạc đính bảo lộc ở nghiệm thức phun đạm cá.

Hình 3.47. Cây con Hạc đính nâu ở nghiệm thức phun Nitrophoska Foliar.

c. Ảnh hưởng của độ che sáng

Ánh sáng là yếu tố quan trọng cho sự sinh trưởng của cây. Nó rất cần cho quá trình quang hợp để tổng hợp được các chất hữu cơ. Các chất này làm nguyên liệu để xây dựng nên cơ thể và tích lũy năng lượng ở trong cây. Khi được che bóng, tăng trưởng chiều cao của cây con diễn ra nhanh nhưng đường kính nhỏ, sức sống yếu và thường bị đổ ngã khi gặp gió lớn. Trái lại, khi gặp điều kiện chiếu sáng mạnh, tăng trưởng chiều cao của cây con diễn ra chậm, có đường kính lớn, thân cây cứng và nhiều cành.

Nói chung, việc che sáng giúp cây con tránh được những tác động cực đoan của môi trường, làm giảm khả năng thoát hơi nước, đồng thời làm giảm nhiệt độ của cây và của hỗn hợp ruột bầu. Sự sống sót ban đầu của cây con ở điều kiện đất trồng rừng cũng phụ thuộc vào việc điều chỉnh ánh sáng trong giai đoạn gieo ươm. Những cây con sinh trưởng với cường độ ánh sáng thấp sẽ hình thành các lá chịu bóng. Nếu bất ngờ đưa chúng ra ngoài ánh sáng và kèm theo điều kiện ẩm độ, nhiệt độ thay đổi, chúng sẽ bị ức chế bởi ánh sáng mạnh. Điều này có thể làm cho cây con bị chết hoặc giảm tăng trưởng cho đến khi các lá chịu bóng được thay thế bằng các lá ưa sáng (Kimmins, 1998). Chế độ ánh sáng được coi là thích hợp cho cây con ở vườn ươm khi nó tạo ra tỷ lệ lớn giữa rễ/chiều cao thân, hình thái tán lá cân đối, tỷ lệ chiều cao/đường kính bằng hoặc gần bằng 1. Đặc điểm này cho phép

cây con có thể sống sót và sinh trưởng tốt khi chúng bị phơi ra ánh sáng hoàn toàn. Vì thế, trong gieo ươm nhà lâm học phải chú ý đến nhu cầu ánh sáng của cây con (Nguyễn Xuân Quát, 1985; Kimmins, 1998; Nguyễn Văn Thêm, 2002; 2003).

Vì ánh sáng quan trọng như vậy nên để đảm bảo tỷ lệ sống sót của cây con cần phải nghiên cứu chế độ ánh sáng thích hợp trong giai đoạn vườn ươm. Chính vì thế chúng tôi tiến hành nghiên cứu chế độ chiếu sáng ở các độ che sáng khác nhau để tìm ra được độ che sáng thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cây con Hạc đính nâu và Hạc đính bảo lộc ngoài vườn ươm. Kết quả sau 60 ngày được thể hiện ở bảng 3.39.

Bảng 3.39. Ảnh hưởng của chế độ che sáng đến sinh trưởng cây con Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu trong giai đoạn vườn ươm.

Nghiệm thức	Hạc đính bảo lộc			Hạc đính nâu		
	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá
Che sáng 50% - 60%	62.73	8.17	5.07	65.22	8.97	4.20
Che sáng 60% - 70%	**96.13**	**15.10**	**6.71**	**97.96**	**15.40**	**6.60**
Che sáng 70% - 80%	69.40	11.90	5.43	70.29	10.89	5.53
LSD 5%		2.01	1.01		1.10	1.03
CV%		7.60	7.80		4.70	9.60

Qua kết quả bảng 3.39 nhận thấy chế độ che sáng có ảnh hưởng quan trọng đến sự sinh trưởng của cây con và kết quả gần tương đương nhau ở cả 2 loài. Ở ba nghiệm thức đều cho tỷ lệ sống của cây con đạt trên 50.00%.

Ở nghiệm thức che sáng 50% - 60%, tỷ lệ sống trung bình của cây con là 62.73% và 65.22%, chiều cao cây trung bình là 8.17 cm và 8.97 cm, số lá trung bình là 5.07 lá và 4.20 lá lần lượt ở Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu.

Nghiệm thức che sáng 70% - 80% có các chỉ tiêu theo dõi đều cao hơn so với nghiệm thức che sáng 50% - 60%. Ở nghiệm thức này, cả 2 loài Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu có tỷ lệ sống trung bình 69.40% và 70.29%, chiều cao cây đạt 11.90 cm và 10.89 cm, số lá trung bình là 5.43 lá và 5.53 lá, do độ che sáng cao nên cây bị vóng, thân cây vươn cao để tìm ánh sáng và lá chỉ có thể tiến hành quang hợp yếu do đó cây rất mảnh, lá nhỏ và nhạt màu.

Nghiệm thức có chế độ che sáng thích hợp nhất cho cây con Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu trong giai đoạn vườn ươm là nghiệm thức che sáng 60% -

70%, tỷ lệ sống trung bình đạt 96.13% và 97.96%, chiều cao cây trung bình đạt 15.10 cm và 15.40 cm, số lá trung bình 6.71 lá và 6.60 lá. Do có mức ánh sáng phù hợp nên cây quang hợp tốt, lá to, có màu xanh đậm.

Như vậy, chế độ che sáng phù hợp của cây con Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu trong giai đoạn vườn ươm là 60% - 70%.

Hình 3.48. Cây con Hạc đính nâu ở độ che sáng 60% - 70%.

d. Ảnh hưởng của độ ẩm

Bên cạnh độ che sáng thích hợp thì độ ẩm cũng là một trong những yếu tố quan trọng quyết định đến tốc độ sinh trưởng và phát triển của cây con. Khi có độ ẩm thích hợp cây con sẽ phát triển nhanh hơn và sức đề kháng cao. Trong giai đoạn vườn ươm, việc điều khiển số lần tưới phun sương có ý nghĩa rất quan trọng trong việc duy trì độ ẩm thích hợp cho cây con. Mỗi loài lan thì có ẩm độ thích hợp riêng, vì vậy chúng tôi tiếp tục tiến hành thí nghiệm để tìm ra độ ẩm thích hợp cho cây con *in vitro* thông qua nghiên cứu số lần tưới phun sương trong ngày. Kết quả nghiên cứu sau 60 ngày được thể hiện ở bảng 3.40.

Bảng 3.40. Ảnh hưởng của độ ẩm đến sinh trưởng cây con Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu trong giai đoạn vườn ươm.

Độ ẩm	Tỷ lệ sống (%)		Trạng thái phát triển của cây
	Hạc đính bảo lộc	Hạc đính nâu	
30% - 40% (Tưới phun sương 1 lần/ngày)	40.40	41.91	Lá hơi vàng, cây còi cọc và kém phát triển.
50% - 60% (Tưới phun sương 2 lần/ngày)	**97.40**	**98.11**	**Lá có màu xanh đậm, cây sinh trưởng tốt.**
70% - 80% (Tưới phun sương 3 lần/ngày)	70.47	72.51	Lá màu xanh nhạt.
Trên 90% (Tưới phun sương 4 lần/ngày)	42.40	45.62	Lá có dấu hiệu úng nước, cây kém phát triển.
LSD 5%	0.64	0.96	
CV%	0.50	0.70	

Qua kết quả bảng 3.40, tỷ lệ sống và trạng thái phát triển của cây ở các khoảng độ ẩm khác nhau là khác nhau. Khoảng độ ẩm từ 30% - 40% (tưới phun sương 1 lần/ngày) cho tỷ lệ sống sót thấp nhất Hạc đính bảo lộc là 40.40% và 41.91% ở Hạc đính nâu, tỷ lệ sống thấp như vậy có thể do hàm lượng nước ít, độ ẩm thấp so với nhu cầu của cây nên rễ cây tiến hành hô hấp kém tích lũy các chất gây độc làm cho tế bào lông hút bị chết và không hình thành được lông hút mới. Do đó cây không hấp thu được nước dẫn đến mất cân bằng nước làm cho lá cây hơi vàng, cây còi cọc, kém phát triển héo dần rồi chết.

Khi độ ẩm tăng 50% - 60% (tưới phun sương 2 lần/ngày) cho tỷ lệ cây sống cao nhất đạt 97.40% ở Hạc đính bảo lộc và 98.11% ở Hạc đính nâu, ở nghiệm thức này cây sinh trưởng tốt nhất, do lượng nước cung cấp vừa đủ đảm bảo độ ẩm thích hợp nhất, lá của cây con có màu xanh đậm, bộ rễ phát triển tốt thuận lợi cho cây con sinh trưởng và phát triển. Trong điều kiện độ ẩm 70% - 80% (tưới phun sương 3 lần/ngày) thì nhận thấy tỷ lệ sống của cây con giảm xuống 70.47% và 72.51% lần lượt ở Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu, cây sinh trưởng chậm, lá có màu xanh nhạt.

Khi độ ẩm tăng lên trên 90% (tưới phun sương 4 lần/ngày) thì tỷ lệ sống sót chỉ còn 42.40% ở Hạc đính bảo lộc và 45.62% ở Hạc đính nâu, lượng nước cung cấp cho cây và độ ẩm quá cao làm cho cây con có dấu hiệu bị úng dẫn đến cây kém phát triển.

Như vậy, điều kiện độ ẩm 50% - 60% (tưới phun sương 2 lần/ngày) là phù hợp nhất cho sự sinh trưởng của Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu trong giai đoạn vườn ươm.

3.3.1.3. Lan Hài vàng

a. Ảnh hưởng của các loại giá thể

Đối với Lan Hài vàng, chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm với các loại giá thể là bột xơ dừa, đất sạch Eco, trấu hun phối trộn đất sạch Eco (1:1) và dớn mút. Kết quả thu được sau 60 ngày đưa cây ra vườn ươm được thể hiện trong bảng 3.41 và hình 3.49.

Bảng 3.41. Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống và phát triển cây con Lan Hài vàng trong giai đoạn vườn ươm.

Giá thể	Tỷ lệ sống (%)	Hình thái cây
Bột xơ dừa	73.33	Lá xanh nhạt, chưa ra rễ mới.
Đất sạch Eco	80.00	Lá xanh nhạt, rễ dài ra ít.
Trấu hun phối trộn đất sạch Eco (1:1)	82.22	Lá hơi vàng, rễ phát triển chậm.
Dớn mút	**95.56**	**Lá đậm, ra rễ mới, cây phát triển tốt.**

Qua kết quả bảng 3.41 nhận thấy các loại giá thể khác nhau cũng có ảnh hưởng khác nhau đến tỷ lệ sống của cây Lan Hài vàng. Ở giá thể bột xơ dừa cây có tỷ lệ sống thấp nhất là 73.33%, lá xanh nhạt, không ra rễ mới, một phần các rễ cũ thối đen và một số cây có hiện tượng thối cổ rễ. Giá thể là đất sạch Eco và giá thể trấu hun phối trộn đất sạch Eco (1:1) cây có tỷ lệ sống cao hơn, lần lượt đạt 80.00% và 82.22%, thân vẫn cứng cáp không bị thối tuy nhiên lá bị khô rụng, có cây chỉ còn 1 - 2 lá, chưa có rễ mới, cây phát triển chậm. Giá thể dớn mút cây có tỷ lệ sống cao nhất 95.56%, ở giá thể này cây con phát triển tốt nhất với lá xanh đậm, có rễ mới, một số cây hình thành chồi non (Hình 3.49d).

Như vậy, giá thể thích hợp nhất để trồng cây con Lan Hài vàng ngoài vườn ươm là giá thể dớn mút.

Hình 3.49. Cây con Lan Hài vàng trồng trên các giá thể khác nhau. (a). Bột xơ dừa; (b). Đất sạch Eco; (c). Trấu hun phối trộn đất sạch Eco (1:1); (d). Dớn mút.

b. Ảnh hưởng của các loại phân bón

Mỗi loài lan có những nhu cầu khác nhau về dinh dưỡng trồng. Việc tìm hiểu ảnh hưởng của các loại dinh dưỡng qua lá đến khả năng sinh trưởng, phát triển của cây Lan Hài vàng thu thập nhằm xác định loại dinh dưỡng tốt nhất cho giai đoạn sinh trưởng vườn ươm. Sau 60 ngày tiến hành thí nghiệm, kết quả thu được thể hiện ở bảng 3.42.

Bảng 3.42. Ảnh hưởng của phân bón đến tỷ lệ sống và phát triển cây con Lan Hài vàng trong giai đoạn vườn ươm.

Phân bón	Chiều cao cây (cm)	Số lá	Hình thái cây
Đối chứng	7.50	2.89	Cây phát triển yếu, lá mảnh.
Komic	8.70	3.76	Cây phát triển khá chậm, lá xanh nhạt.
Antonik	**13.70**	**5.04**	**Cây phát triển tốt, cứng cáp, lá xanh đậm, dày.**
Yogen N02	11.50	3.16	Cây phát triển chậm, lá nhỏ, mảnh, hơi vàng.
LSD 5%	1.24	0.54	
CV%	6.00	7.30	

Qua kết quả ở bảng 3.42 nhận thấy có sự sai khác giữa các chế phẩm dinh dưỡng qua lá về chiều cao cây cũng như hình thái của cây con. Ở nghiệm thức đối chứng cây phát triển yếu, lá mảnh (Hình 3.50a), chiều cao cây và số lá trung bình lần lượt là 7.50 cm và 2.89 lá. Sở dĩ vậy do bộ rễ của cây chưa kịp thích nghi với điều kiện môi trường nên khả năng hút dinh dưỡng kém, chưa cung cấp được đầy đủ dinh dưỡng cho cây. Khi sử dụng phân bón lá Komic thì cây khá chậm phát triển, chiều cao cây chỉ đạt 8.70 cm và số lá trung bình 3.76 lá (Hình 3.50b). Còn khi phun bằng Yogen N02 thì cây phát triển chậm, lá nhỏ, mảnh, hơi vàng (Hình 3.50d), có thể cây Lan Hài vàng không thích hợp với tỷ lệ N-P-K trong loại phân bón này.

Khi bổ sung Antonik, cây hấp thụ dinh dưỡng nhanh, đầy đủ hơn giúp cây phát triển mạnh, chiều cao đạt 13.70 cm và số lá trung bình là 5.04 lá (Hình 3.50c). Cây phát triển tốt, cứng cáp, lá xanh đậm, dày hơn hẳn các loại phân bón lá khác. Các chất dinh dưỡng qua những vẩy và lông trên mặt lá thấm vào lá, tới các mô, qua màng bán thấm của tế bào, đẩy mạnh quá trình đồng hóa và vận chuyển chất trong quá trình phát triển của cây trồng, từ cơ sở đó góp phần làm cho cây sinh trưởng phát triển tốt và cho năng suất cao.

Như vậy, sử dụng phân bón lá Antonik là thích hợp cho sự sinh trưởng của cây Lan Hài vàng *in vitro* giai đoạn vườn ươm.

Hình 3.50. Cây con Lan Hài vàng ở các loại chế phẩm dinh dưỡng khác nhau
(a). ĐC; (b). Komic; (c). Antonik; (d). Yogen N02.

c. Ảnh hưởng của độ che sáng

Ánh sáng là một trong những nhân tố sinh thái quan trọng có ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng sinh trưởng của cây trồng và ở mỗi giai đoạn tuổi khác nhau thì nhu cầu về ánh sáng cũng khác nhau. Chính vì thế chúng tôi tiến hành nghiên cứu chế độ chiếu sáng ở các cường độ che sáng khác nhau để tìm ra được cường độ che sáng thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cây con Lan Hài vàng ngoài vườn ươm. Kết quả sau 60 ngày được thể hiện ở bảng 3.43.

Bảng 3.43. Ảnh hưởng của cường độ che sáng đến sinh trưởng cây con Lan Hài vàng trong giai đoạn vườn ươm.

	Tỷ lệ sống (%)	**Chiều cao cây (cm)**	**Số lá**
Che sáng 50% - 60%	67.67	9.50	4.76
Che sáng 60% - 70%	**100.00**	**16.10**	**6.11**
Che sáng 70% - 80%	76.00	12.53	3.87
LSD 5%		1.23	0.54
CV%		4.30	4.90

Qua kết quả bảng 3.43 nhận thấy chế độ che sáng có ảnh hưởng quan trọng đến sự phát triển của cây con Lan Hài vàng. Ở nghiệm thức che sáng 50% - 60% tỷ lệ sống của cây con là 67.67%, chiều cao cây chỉ đạt trung bình 9.50 cm và số lá trung bình là 4.76 lá, cả ba chỉ tiêu này thấp hơn hơn hẳn so với nghiệm thức ở các chế độ che sáng khác. Do chế độ ánh sáng quá cao nên cây tiến hành quang hợp kém và bị mất nước làm cho lá vàng có vết nhăn và khô, mép lá có xu hướng cụp vào (Hình 3.51a). Ở 2 nghiệm thức còn lại, tỷ lệ sống của cây con đều đạt trên 70.00%. Ở nghiệm thức che sáng 70% - 80%, tỷ lệ sống trung bình của cây con

là 76.00%, chiều cao cây trung bình là 12.53 cm và số lá trung bình là 3.87 lá, độ che sáng cao nên cây bị vóng, lá nhỏ và nhạt màu. Cây thiếu ánh sáng nên thân cây vươn cao để tìm ánh sáng và lá chỉ có thể tiến hành quang hợp yếu do đó cây rất mảnh. Nghiệm thức có chế độ che sáng thích hợp nhất cho cây con Lan Hài vàng trong giai đoạn vườn ươm là nghiệm thức che sáng 60% - 70%, tỷ lệ sống trung bình đạt 100%, chiều cao cây cũng như số lá cao và nhiều hơn hẳn so với 2 nghiệm thức còn lại, đạt trung bình 6.11 lá và chiều cao cây trung bình là 16.10 cm. Do có mức ánh sáng phù hợp nên cây quang hợp tốt, lá to, có màu xanh đậm. Như vậy, chế độ che sáng phù hợp của cây con Lan Hài vàng trong giai đoạn vườn ươm là 60% - 70%.

Hình 3.51. Cây con Lan Hài vàng ở các độ tàn che khác nhau (a). Độ che sáng 50% - 60%; (b). Độ che sáng 60% - 70%; (c). Độ che sáng 70% - 80%.

Hình 3.52. Cây con Lan Hài vàng ở độ che sáng 70% - 80%.

Hình 3.53. Cây con Lan Hài vàng ở độ che sáng 60% - 70%.

d. Ảnh hưởng của độ ẩm

Bên cạnh các yếu tố như giá thể, phân bón và cường độ che sáng thích hợp thì độ ẩm cũng là một trong những yếu tố quan trọng quyết định đến tốc độ sinh trưởng và phát triển của cây con Lan Hài vàng. Khi có độ ẩm thích hợp cây con sẽ phát triển nhanh hơn và sức đề kháng cao. Trong giai đoạn vườn ươm việc điều khiển số lần tưới phun sương có ý nghĩa rất quan trọng trong việc duy trì độ ẩm với các khoảng độ ẩm thích hợp cho cây con. Mỗi loài lan thì có ẩm độ thích hợp riêng, vì vậy chúng tôi tiếp tục tiến hành thí nghiệm để tìm ra độ ẩm thích hợp cho cây con *in vitro* Lan Hài vàng thông qua nghiên cứu số lần tưới phun sương trong ngày. Kết quả sau 60 ngày được thể hiện ở bảng 3.44.

Bảng 3.44. Ảnh hưởng của độ ẩm đến sinh trưởng cây con Lan Hài vàng trong giai đoạn vườn ươm.

Độ ẩm	Tỷ lệ sống (%)	Trạng thái phát triển của cây
30% - 40% (Tưới phun sương 1 lần/ngày)	41.47	Lá hơi vàng, cây còi cọc và kém phát triển.
50% - 60% (Tưới phun sương 2 lần/ngày)	68.49	Lá màu xanh nhạt, cây sinh trưởng chậm.
70% - 80% (Tưới phun sương 3 lần/ngày)	**90.18**	**Lá có màu xanh đậm, cây sinh trưởng tốt.**
Trên 90% (Tưới phun sương 4 lần/ngày)	49.62	Lá có dấu hiệu úng nước, cây kém phát triển.
LSD 5%	0.93	
CV%	0.80	

Qua kết quả bảng 3.44 nhận thấy: Tỷ lệ sống sót và trạng thái phát triển của cây ở các khoảng độ ẩm khác nhau là khác nhau. Khoảng độ ẩm từ 30% - 40% (tưới phun sương 1 lần/ngày) cho tỷ lệ sống sót thấp nhất 41.47% do hàm lượng nước ít, độ ẩm thấp so với nhu cầu của cây nên rễ cây tiến hành hô hấp kém tích lũy các chất gây độc làm cho tế bào lông hút bị chết và không hình thành được lông hút mới. Do đó cây không hấp thu được nước dẫn đến mất cân bằng nước làm cho lá cây hơi vàng, cây còi cọc, kém phát triển héo dần rồi chết.

Khi độ ẩm tăng 50% - 60% (tưới phun sương 2 lần/ngày) thì nhận thấy tỷ lệ sống của cây con tăng lên 68.49%, tuy nhiên cây vẫn sinh trưởng kém, lá có màu xanh nhạt. Trong điều kiện độ ẩm 70% - 80% (tưới phun sương 3 lần/ngày) cho tỷ lệ cây sống sót cao nhất đạt 90.18%, cây sinh trưởng rất tốt do lượng nước cung cấp vừa đủ đảm bảo độ ẩm thích hợp nhất, lá của cây con có màu xanh đậm, bộ rễ phát triển tốt thuận lợi cho cây con sinh trưởng và phát triển.

Khi độ ẩm tăng lên trên 90% (tưới phun sương 4 lần/ngày) thì tỷ lệ sống sót chỉ còn 49.62%, lượng nước cung cấp cho cây và độ ẩm quá cao làm cho cây con có dấu hiệu bị úng dẫn đến cây kém phát triển.

Như vậy, điều kiện độ ẩm 70% - 80% (tưới phun sương 3 lần/ngày) là phù hợp cho con Lan Hài vàng trong giai đoạn vườn ươm. Tuy nhiên mức độ tưới này còn phụ thuộc vào thời tiết, vào những ngày mưa thì giảm xuống còn 2 lần phun sương/ngày.

Hình 3.54. Cây con Lan Hài vàng ở các chế độ nước tưới khác nhau. (a). Tưới phun sương 1 lần/ngày; (b). Tưới phun sương 2 lần/ngày; (c). Tưới phun sương 3 lần/ngày; (d). Tưới phun sương 4 lần/ngày.

3.3.1.4. Quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau ống nghiệm

Cây con *in vitro* được nuôi cấy trong điều kiện nhân tạo, được cung cấp đầy đủ chất dinh dưỡng và có môi trường sống lý tưởng. Nhưng khi đưa ra môi trường tự nhiên, các yếu tố dinh dưỡng và môi trường đều thay đổi đột ngột. Vì vậy việc tìm ra chế độ chăm sóc và lượng phân bón thích hợp để kích thích ra rễ, mọc chồi, phòng trừ sâu bệnh giúp cây phát triển nhanh và khỏe mạnh khi ở vườn ươm là rất cần thiết và quan trọng để đảm bảo xây dựng được việc nhân giống hoàn chỉnh. Trên thực tế, đây là giai đoạn rất quan trọng có ảnh hưởng quyết định đến hiệu suất của toàn bộ quá trình nuôi cấy. Bên cạnh đó, mỗi loài cây có một môi trường phù hợp riêng cho sự sinh trưởng, phát triển.

Từ các kết quả nghiên cứu cây con sau ống nghiệm (*vườn ươm*), chúng tôi tiến hành xây dựng các nhóm quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con sau ống nghiệm đối với các loài thuộc chi *Dendrobium*, *Paphiopedilum* và *Phaius* theo các bước như sau:

Bước 1: Tập thích nghi cây con (khoảng 7 - 10 ngày)

Trước khi đưa cây con từ bình mẫu ra vỉ ươm nên để các bình mẫu ngoài vườn ươm để cây con thích nghi dần với điều kiện tự nhiên của vườn. Chú ý để cây mô nguyên trong bình mẫu, chỉ hé mở chút nắp bình cho thoáng khí. Có thể

đặt bình mẫu dưới giàn cây, nơi có ánh sáng ít và nhiệt độ tương đối thấp. Theo thời gian sẽ dần đưa cây ra chỗ sáng hơn. Trong khoảng 7 - 10 ngày khi cây đã bước đầu quen, cây con được đưa ra để trồng cây vào vỉ ươm.

Bước 2: Đưa cây con từ bình mẫu trồng vào các vỉ ươm.

Cây được làm quen với môi trường mới sau 7 - 10 ngày có thể đem trồng. Rửa sạch agar bám ở rễ cây bằng nước. Cần thao tác nhẹ nhàng để không làm đứt và dập rễ. Cây con cũng cần nhúng vào trong nước đã hòa thuốc trị khuẩn và nấm. Cuốn dớn mút bọc rễ trước khi cho vào vỉ, cây con sau khi trồng tiến hành tưới phun sương.

Sự thành bại của giai đoạn đưa cây ra vườn ươm phụ thuộc rất nhiều vào khâu chăm sóc sau khi đưa cây vào vỉ. Cần tưới nước hợp lý không để cây khô héo nhưng đảm bảo tưới không quá đẫm làm cho bộ rễ bị thối. Tùy thuộc vào độ ẩm không khí tưới phun sương khoảng 3 - 4 lần/ngày. Ngưng tưới sau 4h chiều để tránh không khí quá ẩm vào buổi tối.

Sau 2 - 3 ngày đưa cây ra điều kiện nhà kính đối với các loài thuộc nhóm Địa lan (*Paphiopedilum* và *Phaius*) độ ẩm 70 - 80%, ánh sáng 60 - 70% và nhiệt độ dao động từ 20 - 25^{o}C. Sau khi trồng một phần rễ bị tổn thương và chưa ra rễ mới cần bổ sung dinh dưỡng cho cây bằng phân bón lá (sử dụng phân bón lá Antonik đối với Lan Hài vàng, Nitrophoska 20:20:20 đối với Hạc đính nâu và đạm cá đối với Hạc đính bảo lộc). Để tăng khả năng ra rễ giai đoạn này cũng cần phun chất kích thích ra rễ như Auxin.

Ở các loài thuộc nhóm phong lan như *D. trankimianum* và *D. nobile* điều kiện về nhiệt độ, độ ẩm và ánh sáng không khác biệt nhiều so với các loại địa lan, độ ẩm 50 - 60%, ánh sáng 60 - 70% và nhiệt độ dao động từ 20 - 25^{o}C là phù hợp.

Bước 3: Chăm sóc cây con giai đoạn sau 3 tháng sau khi ra cây

Sau 3 tháng cây phát triển bộ rễ quấn chắc trong các lỗ nhỏ trên vỉ xốp, các lá đan xen nhau trên vỉ xốp cần tiếp tục chuyển cây ra các ly nhựa có kích thước lớn hơn (ly có đường kính từ 5 - 7 cm). Giai đoạn này giá thể trồng đối với nhóm địa lan là xơ dừa sạch (dạng đã xay thành bột). Đối với nhóm phong lan thì giá thể sử dụng phù hợp vẫn là dớn mút. Điều kiện chăm sóc ở giai đoạn này dễ dàng hơn, điều kiện tưới giảm xuống còn 2 - 4 lần/ngày. Cây ở giai đoạn này có rễ phát triển, có thể hòa loãng phân NPK (15:15:15) để tưới trực tiếp vào gốc. Về điều kiện nhiệt độ, độ ẩm và ánh sáng không cần thay đổi so với giai đoạn cây con trước 3 tháng.

Bước 4: Chăm sóc cây con giai đoạn sau 6 tháng sau khi ra cây

Giá thể dùng cho giai đoạn này với nhóm địa lan là dớn mút xay và bột xơ dừa (tỷ lệ 1:1), nhóm phong lan vẫn là dớn mút hoặc xơ dừa ép thành khuôn (chậu) là phù hợp. Sau 6 tháng cây cũng cần chuyển sang chậu lớn hơn để bộ rễ phát triển tốt và tạo không gian thoáng cho cây phát triển. Với địa lan chậu có kích

thước đường kính 12 - 15 cm, phong lan kích thước chậu nhỏ hơn, đường kính chậu từ 10 - 12 cm là phù hợp.

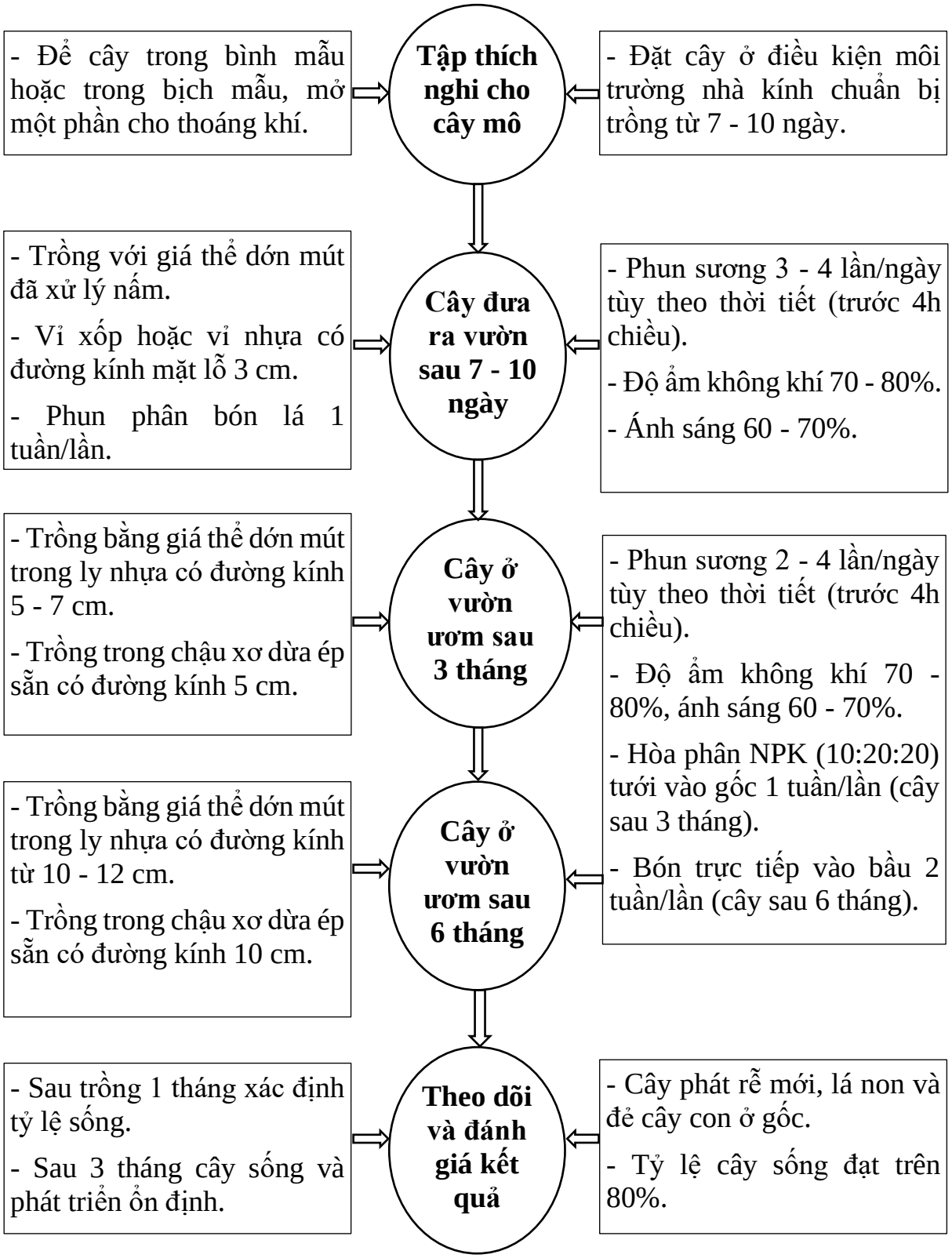
Giai đoạn này là bước đệm tập cho cây con ở vườn ươm thích nghi điều kiện bán hoang dã để cây đủ các tiêu chuẩn trồng ra rừng. Vào giai đoạn này cây con có bộ rễ và thân lá phát triển mạnh, cây con đã ổn định thích nghi với môi trường vườn ươm. Tuy nhiên điều kiện bán hoang dã khắc nghiệt hơn nên hạn chế sử dụng thuốc phòng chống bệnh ở cuối giai đoạn này, tập cho cây chịu hạn giảm lượng nước tưới phun sương xuống 2 - 4 lần/ngày, tùy thuộc độ ẩm không khí. Để tăng cường sức đề kháng, giúp cây cứng cáp hơn cần bón phân NPK (10:20:20) 1.0 g/l 1 tuần/lần. Cây con sau 6 tháng có thể đưa ra môi trường chuyển tiếp để chuẩn bị trồng ra rừng.

Tùy vào tình hình phát triển của cây có thể bón phân bổ sung (Growmore Humic acid 322, đạm cá…) hoặc sử dụng chất kích thích sinh trưởng cho tất cả các giai đoạn phát triển.

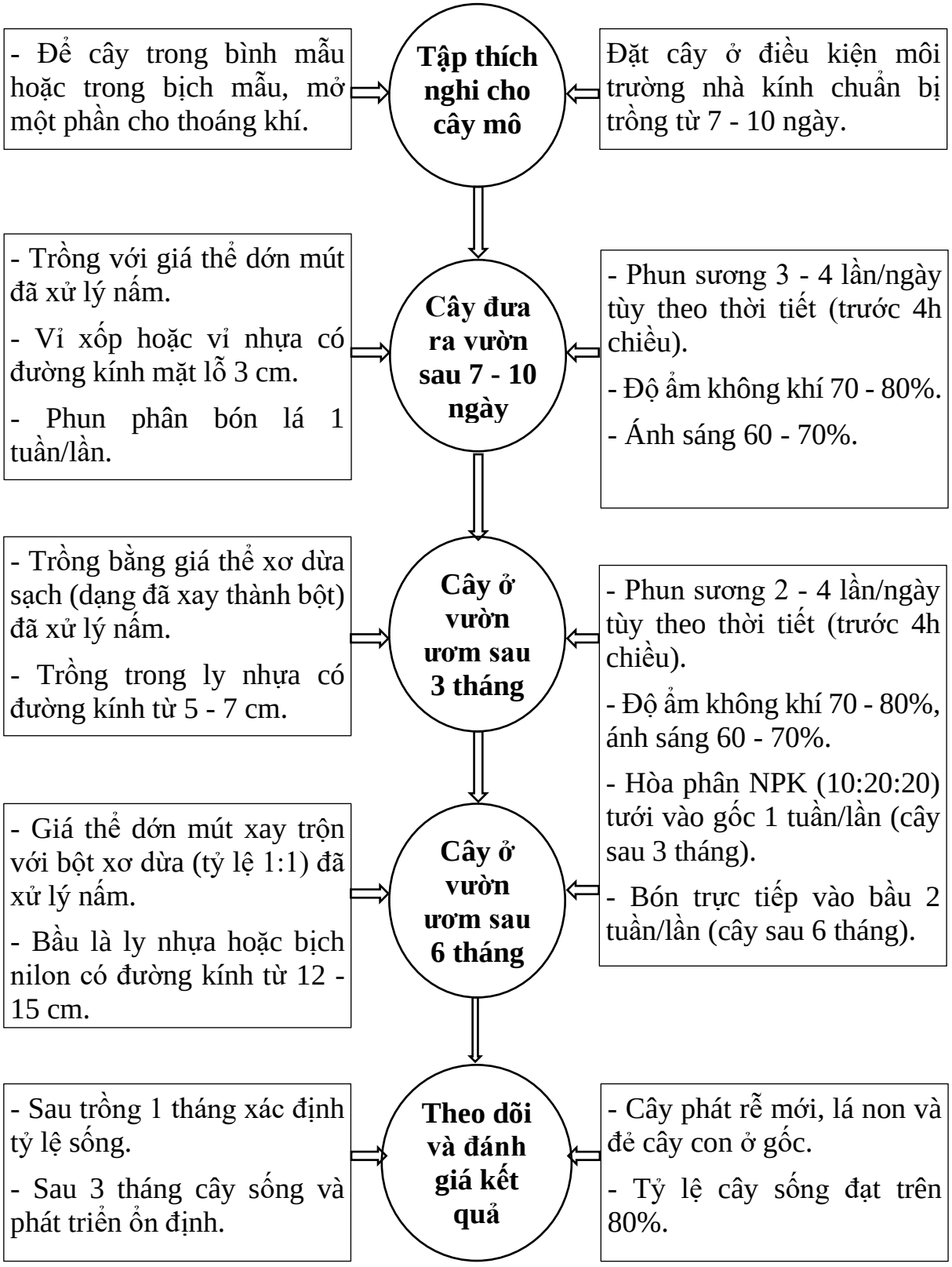
Phòng chống sâu bệnh dùng các loại thuốc bảo vệ thực vật có chứa hoạt chất (Streptomycin, Metalaxyl, Mancozeb, Fosetyl…) để phòng bệnh và nấm. Phun các loài thuốc trừ sâu (Carbofuran, Ethofenprox) hay rải các loại thuốc chống ốc sên ăn lá.

Phun thuốc sau khi trồng và mỗi tuần phun một lần cho tất cả các giai đoạn.

QUY TRÌNH KỸ THUẬT CHĂM SÓC CÂY CON *D. NOBILE* VÀ *D. TRANKIMIANUM* SAU ỐNG NGHIỆM



QUY TRÌNH KỸ THUẬT CHĂM SÓC CÂY CON *PAPHIOPEDILUM VILLOSUM, PHAIUS BAOLOCENSIS* VÀ *PHAIUS TANKERVILLEAE* SAU ỐNG NGHIỆM



3.3.2. Quy trình kỹ thuật chăm sóc cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã, tán rừng tự nhiên

Từ các kết quả nghiên cứu triển khai 3 mô hình, chúng tôi xây dựng các nhóm quy trình kỹ thuật chăm sóc cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã, tán rừng tự nhiên như sau:

3.3.2.1. Quy trình kỹ thuật chăm sóc cây D. nobile và D. trankimianum trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã, tán rừng tự nhiên

Bước 1. Chuẩn bị cây giống

Cây mô ra vườn ươm được 6 tháng đến 1 năm, chiều cao thân khoảng 10 - 15 cm được mang trồng ngoài tự nhiên.

Lựa chọn cây không bị bệnh, khỏe mạnh, cụ thể cây có thân mập, mỗi cụm thường mang 2 thân, 1 thân từ giai đoạn cấy mô và 1 thân thứ 2 đã phát triển ở giai đoạn vườn ươm. Cây con mang khoảng từ 4 - 6 lá.

Cho cây tập quen với điều kiện môi trường tương đồng với nơi chuẩn bị trồng bằng cách mang cây ra vị trí trồng khoảng 1 tuần (nếu đảm bảo an toàn), hoặc mở lưới che từ vườn ươm và hạn chế tưới để cây quen với điều kiện mới trước khi mang trồng.

Bước 2. Chuẩn bị địa điểm trồng

Trước khi chọn địa điểm trồng cần điều tra đánh giá về điều kiện môi trường sinh thái sao cho địa điểm được chọn có sự tương đồng gần nhất với điều kiện sinh thái tự nhiên của đối tượng chuẩn bị trồng. Đối với 2 loài *D. trankimianum* và *D. nobile* thì điều kiện sinh thái phù hợp như sau:

- Khí hậu nhiệt đới mưa ẩm vùng núi cao, có hai mùa mưa - khô.

- Nhiệt độ thích hợp cho loài *D. trankimianum* từ 15 - 22^{o}C và loài *D. nobile* từ 20 - 28^{o}C.

- Độ ẩm không khí tán rừng trồng 70 - 90%. Đặc biệt tốt với rừng ẩm thường có sương mù vào buổi sáng và chiều tối là phù hợp với loài *D. trankimianum.* Lượng mưa vào khoảng từ 1.500 - 2.700 mm/năm của các tỉnh Tây Nguyên là phù hợp cho cả 2 loài.

- Ánh sáng dưới tán rừng có độ tàn che 0.7 - 0.75 (tàn che 70 - 75%).

Bước 3. Cách trồng

- ***Thời gian và dụng cụ***

- *Thời gian:* trồng thích hợp vào đầu mùa mưa (khoảng tháng 4). Cụ thể trồng khi có vài cơn mưa đầu mùa, trồng ngay sau khi mưa tạnh hoặc trước những ngày chuẩn bị mưa.

- *Dụng cụ:*

+ Giá thể giữ ẩm cho lan là dớn mút, bông gòn hay các loại vải có khả năng giữ nước dễ mục nát theo thời gian.

+ Phân bón là phân chậm tan loại hạt, bỏ sẵn trong túi lưới (loại để chụp bông cúc, bông hồng). Phân chậm tan thường sử dụng với tên thương mại là Hi-Control của Nhật Bản với tỷ lệ NPK 14:13:13. Túi lưới cắt ngắn mỗi túi dài 10 cm cho từng cụm lan và loại túi dài trên 40 cm để bắn quanh thân cây.

+ Thang hoặc dụng cụ leo cây.

+ Dây buộc là các loại dây nilon có độ bền trong vòng 1 năm. Tránh sử dụng các loại dây quá bền như dây cước, dây dù hay dây kẽm… vì những loại dây này không bị mục nát sẽ gây thắt thân cây và lan sau 1 thời gian cây lớn.

+ Súng bắn ghim và các loại ghim bấm tùy theo kích cỡ của thân cây, ngoài ra cần chuẩn bị thêm các dụng cụ như túi đựng, dao, kéo, nhãn dán để đánh dấu nếu cần thiết.

- Kỹ thuật trồng (gắn lên cây)

Đặt cụm lan con dựng đứng vòng theo chu vi của thân cây, mật độ gắn mỗi vòng lan cách nhau 70 - 100 cm.

Dùng dớn mút hoặc giá thể giữ ẩm thấm nước bọc đè bên ngoài sao cho gốc và rễ lan nằm giữa vỏ cây và giá thể.

Dùng dây nilon buộc chắc hoặc dùng súng bắn ghim bắn giữ dây nilon tạo thành 1 vòng ôm cây.

Bắn ghim túi lưới (túi dài) ôm 1 vòng quanh thân cây phía trên vòng lan 1 khoảng 5 - 10 cm.

Trồng theo cụm riêng rẽ (với cây nhiều cành nhánh):

Đặt mỗi cụm lan con dựng đứng vào nách cành (phần giữa cành và thân đứng), mật độ gắn mỗi cụm lan phụ thuộc vào độ dày của cành cây. Lan cũng được đặt ở bề mặt phía trên của cành cây lớn nằm ngang, mật độ trồng mỗi cụm cách nhau 50 - 70 cm.

Dùng dớn mút hoặc giá thể giữ ẩm thấm nước bọc đè bên ngoài sao cho gốc và rễ lan nằm giữa vỏ cây và giá thể.

Dùng dây nilon buộc chắc hoặc dùng súng bắn ghim bắn giữ dây nilon.

Bắn ghim túi lưới đã bỏ phân phía trên mỗi cụm lan sao cho cách gốc lan 5 - 10 cm.

Bước 4. Chăm sóc

- Đối với cây mọc hoang dã.

Thường xuyên theo dõi cắt bớt cành nhánh không cần thiết, các loại dây leo bám trên cây chủ để tạo không gian thông thoáng cho lan phát triển.

- Tưới nước và bón phân

Cây phong lan có thể chịu hạn vài tuần đến 1 - 2 tháng. Nhưng để đảm bảo cho cây phát triển tốt trong vòng một tuần sau khi trồng nếu trời không mưa chúng ta cần tưới cho lan hoặc tưới cho lan khi thấy giá thể khô.

Tùy theo sự phát triển của lan mà theo định kỳ 6 tháng thay 1 lần túi lưới đựng phân.

- Phòng tránh bệnh hại

Giai đoạn đầu cây mới trồng ra ngoài tự nhiên, nên sức chống chịu của cây đối với các tác nhân gây bệnh còn yếu. Để tránh các nấm bệnh và côn trùng phá hoại cần sử dụng thuốc bảo vệ thực vật để phun phòng trừ 1 - 2 tháng một lần.

Bước 5. Theo dõi đánh giá kết quả

- Với các loại phong lan thường ít hao hụt khi buộc trên các thân cây. Sau khi trồng 2 - 3 tháng tiến hành trồng dặm thay thế cây bị chết, rơi do đứt dây hoặc bị các loại Sóc phá hoại. Sau 6 tháng đến 1 năm hoặc sau mùa mưa là cây phát triển ổn định. Cây sống đạt trên 80% là thành công.

- Những dấu hiệu để đánh giá cây đã ổn định và phát triển:

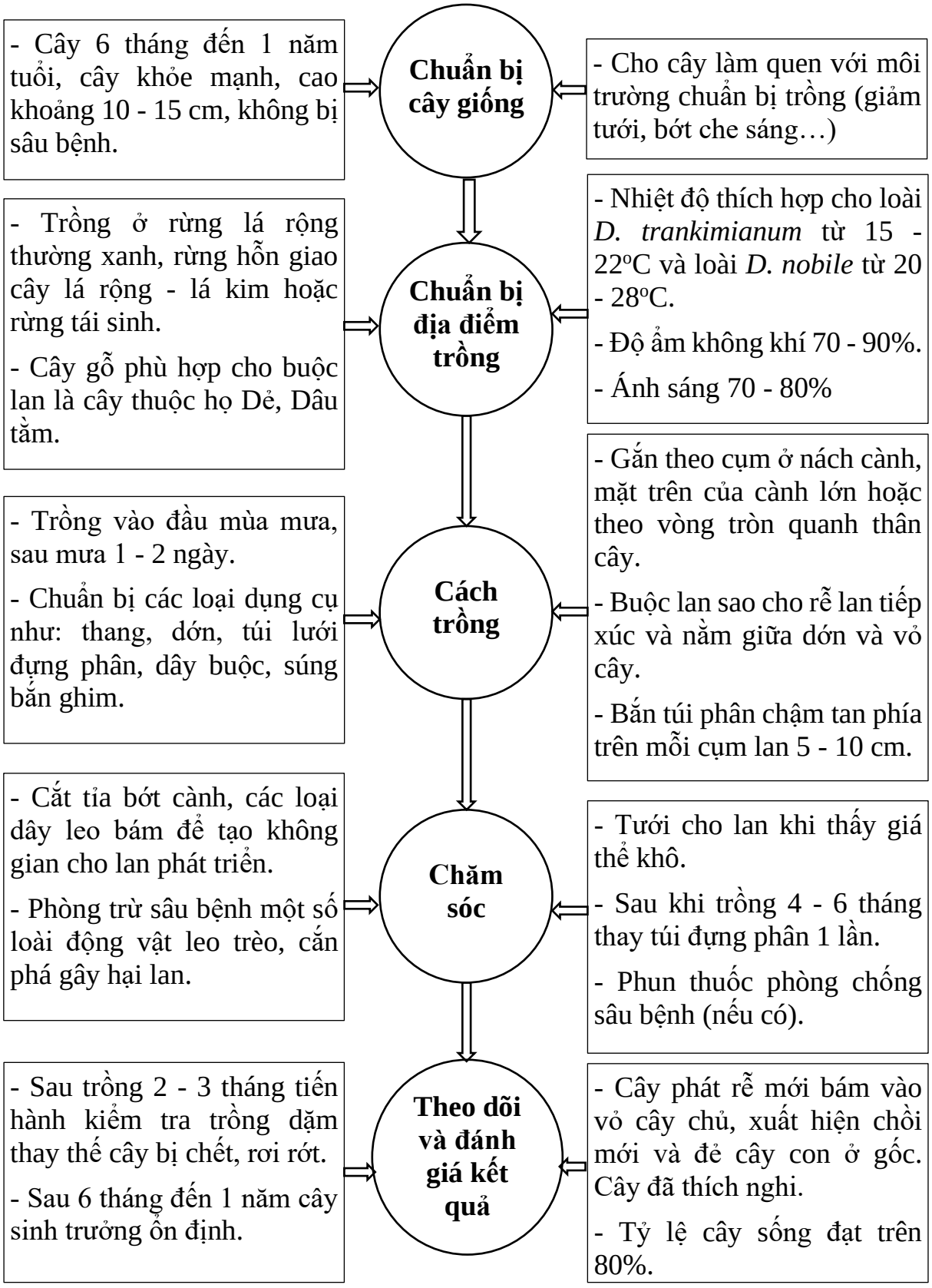
+ Cây ra rễ mới bám chắc vào lớp vỏ cây chủ;

+ Cây phát chồi mới, thêm các đốt và nhiều lá non;

+ Cây đẻ nhánh tạo cây con ở gốc cây mẹ;

Kết quả trồng được xem thành công khi cây đã thích nghi chống chịu được sâu bệnh, khả năng sinh trưởng và phát triển, nở hoa ở môi trường trong tự nhiên.

QUY TRÌNH KỸ THUẬT CHĂM SÓC CÂY *D. NOBILE* VÀ *D. TRANKIMIANUM* TRƯỞNG THÀNH VỀ KHẢ NĂNG THÍCH NGHI VỚI ĐIỀU KIỆN BÁN HOANG DÃ, TÁN RỪNG TỰ NHIÊN



3.3.2.2 Quy trình kỹ thuật chăm sóc cây Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis và Phaius tankervilleae trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã, tán rừng tự nhiên

Bước 1. Chuẩn bị cây giống

- Cây mô ra vườn ươm được 6 tháng đến 1 năm, chiều cao cây (tính cả lá) cao khoảng 15 - 20 cm được mang trồng ra ngoài tự nhiên.

- Lựa chọn cây không bị bệnh, khỏe mạnh, dựa trên số lá để đánh giá sức khỏe của cây, với cây *Paphiopedilum villosum* có từ 4 - 6 lá, cây *Phaius baolocensis* và *Phaius tankervilleae* mang 3 - 5 lá và có thân củ to là cây đủ tiêu chuẩn để trồng.

- Trước khi trồng 1 tuần, để cây ra tự nhiên cho cây tập quen với điều kiện môi trường nơi chuẩn bị trồng (giảm tưới, bớt che sáng hoặc mang ra địa điểm trồng trước khi trồng 1 tuần).

Bước 2. Chuẩn bị địa điểm trồng.

- Khí hậu:

Trước khi chọn địa điểm trồng cần điều tra đánh giá về điều kiện môi trường sinh thái sao cho địa điểm được chọn có sự tương đồng gần nhất với điều kiện sinh thái tự nhiên của đối tượng chuẩn bị trồng. Đối với 3 loài *Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis* và *Phaius tankervilleae* thì điều kiện sinh thái phù hợp như sau:

- Khí hậu nhiệt đới mưa ẩm vùng núi cao, có hai mùa mưa - khô.

- Nhiệt độ thích hợp cho 3 loài *Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis* và *Phaius tankervilleae* từ 20 - 25^{o}C. Riêng với loài *Phaius baolocensis* có thể chịu được nhiệt độ cao hơn.

- Độ ẩm không khí bình quân khoảng 70 - 90%. Đặc biệt tốt với rừng ẩm thường xanh có sương mù vào buổi sáng và chiều tối. Lượng mưa vào khoảng từ 1.500 - 2.700 mm/năm của các tỉnh Tây Nguyên là phù hợp.

- Ánh sáng dưới tán rừng có độ tàn che 0.7 - 0.75 (tàn che 70 - 75% ánh sáng).

- Địa hình:

Chọn địa hình tương đối bằng phẳng, chân núi, ven các con suối để đất ẩm trong khoảng 50 - 75%, nhưng không quá gần nước để đảm bảo mùa mưa không bị ngập nước. Độ dốc thích hợp vào khoảng 20 - 30^{o}.

Đất phù hợp là đất mùn không quá dày, khoảng 15 - 25 cm, đảm bảo khi trồng cây lan có thể phát triển bộ rễ tiếp cận giữa phần đất thịt và đất mùn. Tầng dưới mùn là đất pha lẫn đá hoặc đất đỏ bazan đều thích hợp cho trồng các loài Địa lan.

Bước 3. Cách trồng

- Thời gian

Thời gian trồng thích hợp vào đầu mùa mưa (khoảng tháng 4). Cụ thể là trồng khi có vài cơn mưa đầu mùa, sau 1 - 2 ngày mưa tạnh đảm bảo đất còn ẩm nhưng không quá nhiều nước gây úng cây. Với điều kiện trời nắng và đất khô cần tưới nước sau khi trồng cây.

- Kỹ thuật trồng

Trồng cây theo hàng: sử dụng cuốc tạo các hàng theo đường đồng mức để giảm sự rửa trôi lớp mùn bởi độ dốc và tác động của dòng chảy khi có mưa. Đối với các loài *Phaius*, các hàng trồng cách nhau từ 30 - 40 cm. Độ sâu của rãnh trồng sao cho vừa lấp đầy củ lan, thường là 8 - 10 cm. Đối với loài *Paphiopedilum* độ sâu rãnh trồng là 5 - 8 cm, đảm bảo cho rễ lan vừa tiếp xúc với lớp đất thịt và đất mùn.

Trồng theo cụm riêng rẽ: sử dụng cuốc hoặc bay nhỏ để tạo lỗ nhỏ sâu 8 - 10 cm (với Lan Hài 5 - 8 cm), rộng vừa với bầu của cây giống, đối với các loài thuộc chi *Phaius* mỗi gốc trồng cách nhau 30 - 40 cm (với Lan Hài là 20 - 30 cm), nên trồng so le cây cách cây theo hình tam giác cân.

Tiến hành bón lót phân trực tiếp vào hố và rãnh trồng hoặc trộn phân với lớp đất để vùi gốc. Hầu hết các loại phân NPK có thể sử dụng, ưu tiên sử dụng phân bón có tỷ lệ Lân và Kali cao hơn Nitơ để cây có sức đề kháng tốt (NPK 10:20:20). Lượng phân bón được ước lượng khoảng 8 - 10 hạt cho mỗi cây.

Khi trồng cây chú ý hạn chế làm bể bầu, gãy rễ và cổ rễ. Lấp đất hết cổ rễ tránh vùi quá sâu che lấp chồi lan, đặc biệt là loài *Paphiopedilum villosum* có thân rất ngắn.

Bước 4. Chăm sóc

- Đối với cây mọc hoang dã.

Phát cây bụi và cỏ định kỳ trước và sau mùa mưa hoặc tùy theo điều kiện cụ thể để phát quang, làm cỏ sao cho cây cỏ hoa dại mọc không lấn át cây lan. Đối với cây cỏ nhỏ phát triển không vượt quá tán của lan chúng ta có thể giữ lại để giữ mùn, giữ độ ẩm cho cây. Cần lưu ý chỉ phát và loại bỏ cây lấn át lan và cây mọc sát gốc với lan để tránh sự cạnh tranh về dinh dưỡng. Với những cây có tầng vượt tán trên 2 m cần được giữ lại để tạo tán giảm ánh sáng chiếu trực tiếp vào lan, chú ý chỉ phát quang cành nhỏ ở tầng dưới 2 m.

- Tưới nước và bón phân

Tưới nước vào mùa khô một tuần tưới nước 2 - 3 lần. Thông thường với điều kiện tự nhiên đất có độ ẩm cao nhờ vào tầng thảm mục nên việc tưới cho lan cũng không nhiều.

Tùy thuộc vào lớp thảm mục, mùn dày hay mỏng để bổ sung dinh dưỡng nhiều hay ít. Thông thường bón phân vào giai đoạn đầu và 2 - 3 tháng một lần.

- Phòng tránh bệnh hại

Giai đoạn đầu cây mới trồng ra ngoài tự nhiên, nên sức chống chịu của cây đối với các tác nhân gây bệnh còn yếu. Để tránh các nấm bệnh và côn trùng phá hoại, cần sử dụng thuốc bảo vệ thực vật để phun phòng trừ 1 - 2 tháng một lần.

Bước 5. Theo dõi đánh giá kết quả

- Sau 2 - 3 tháng có thể trồng dặm thay thế những cây đã chết. Sau 6 tháng đến 1 năm lúc này cây sinh trưởng ổn định. Tỷ lệ cây sống đạt trên 80%.

- Những dấu hiệu để đánh giá cây đã ổn định và phát triển:

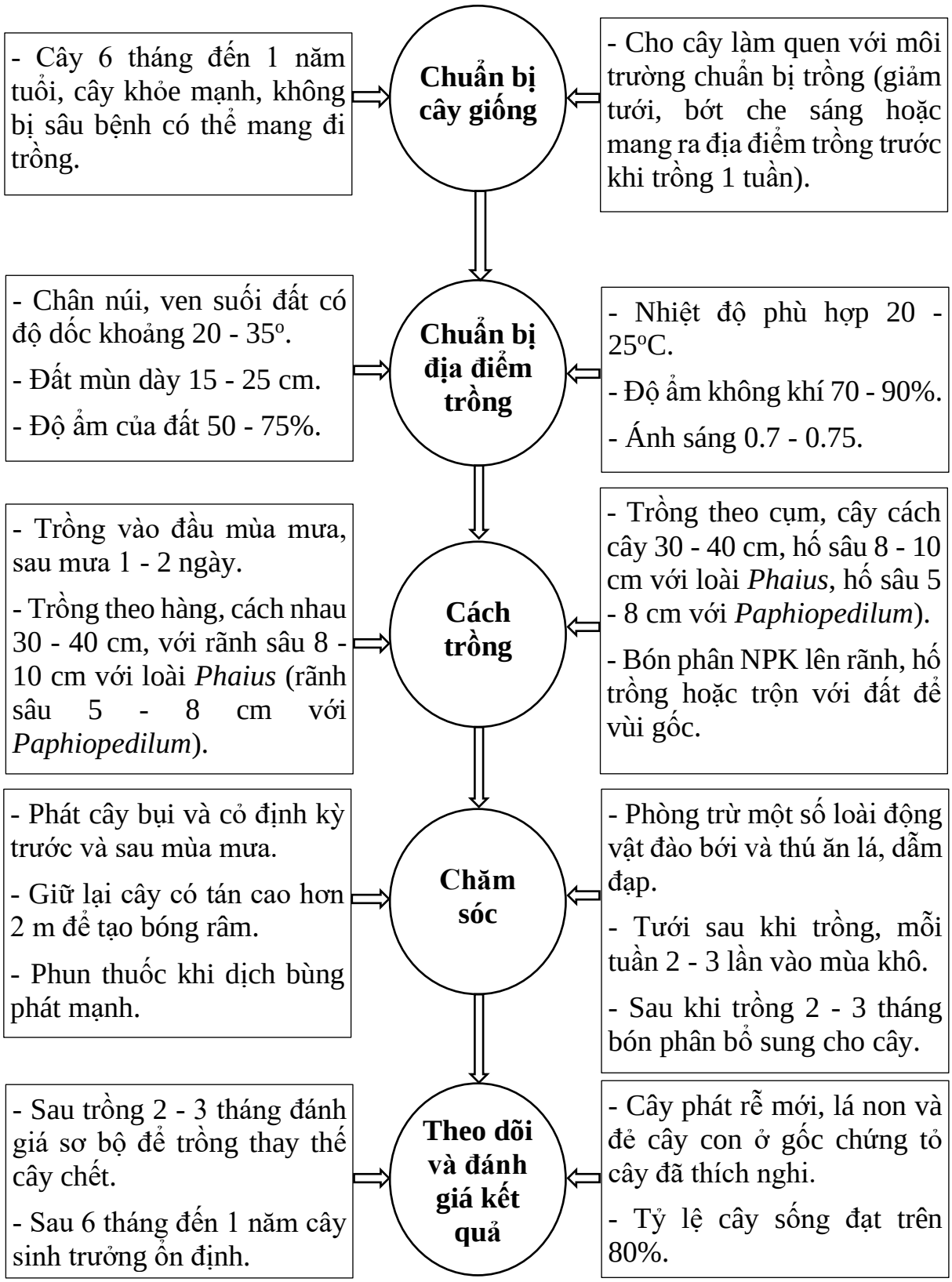
+ Cây phát chồi mới, có nhiều lá non;

+ Cây đẻ nhánh tạo cây con ở gốc cây mẹ;

+ Kiểm tra rễ nếu cây có rễ mới phát triển là cây có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt ở môi trường hoang dã.

Kết quả trồng được xem thành công khi cây đã thích nghi chống chịu được sâu bệnh, khả năng sinh trưởng và phát triển, nở hoa ở môi trường trong tự nhiên.

QUY TRÌNH KỸ THUẬT CHĂM SÓC CÂY *PAPHIOPEDILUM VILLOSUM, PHAIUS BAOLOCENSIS* VÀ *PHAIUS TANKERVILLEAE* TRƯỞNG THÀNH VỀ KHẢ NĂNG THÍCH NGHI VỚI ĐIỀU KIỆN BÁN HOANG DÃ, TÁN RỪNG TỰ NHIÊN



3.4. Xây dựng mô hình trồng lan bán hoang dã

3.4.1. Các bước triển khai xây dựng mô hình

3.4.1.1. Xử lý thực bì

Trước khi làm đất để triển khai mô hình phải phát dọn thực bì. Thực bì là những thực vật sống trên đất trồng rừng, thực bì trên đất trồng rừng hầu như đều là cỏ dại như Mua, Sim, Lau,… Nhìn chung, cây cỏ dại là có hại cho cây trồng, vì chúng cạnh tranh ánh sáng, nước, dinh dưỡng khoáng với cây trồng, cây cỏ dại còn là nơi ẩn náu của sâu bệnh hại. Vì vậy trước khi làm đất để triển khai mô hình, tùy theo mức độ dày đặc, cao, thấp của thực bì, cây trồng ưa sáng hay chịu bóng, sinh trưởng nhanh hay chậm, đất bằng hay dốc, xói mòn mạnh hay yếu… mà quyết định phương thức xử lý thực bì. Đối với khu vực triển khai mô hình tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, chúng tôi đã chọn 02 phương thức xử lý thực bì như sau:

- Phát dọn toàn diện: chúng tôi đã dọn trên toàn bộ diện tích 500 m^2 dưới tán rừng cây của Viện. Việc phát dọn được thực hiện 02 tháng trước khi triển khai mô hình. Thực bì được phát dọn, sau khi tận dụng những cây có thể dùng được, số cây còn lại rải đều trên mặt đất, phơi khô rồi đốt hoặc chất thành đống nhỏ, chờ khô rồi đốt.

Trước khi đốt chúng tôi đã tiến hành làm đường băng cản lửa, quét dọn sạch cành khô, lá rụng, đốt lúc lặng gió, chăm lửa đốt từ phía cuối ngọn gió, cử người trông coi trong suốt quá trình đốt. Ưu điểm của xử lý bằng cách đốt là đỡ tốn công, tăng lượng tro cho đất và diệt được một số sâu bệnh hại.

- Phát dọn theo băng, theo dải: Phương pháp này được áp dụng dưới tán rừng cây lá kim của Viện. Tùy theo từng khu vực mà chúng tôi xác định bề rộng băng chặt tương ứng. Trên băng chặt, dùng dao chặt sát gốc toàn bộ cây cỏ dại, chỉ để lại những cây tái sinh có giá trị.

3.4.1.2. Làm đất, đào hố, bón phân

Làm đất bằng thủ công, hố cuốc trước khi trồng 7 - 10 ngày. Làm đất cơ giới bằng cày toàn diện hoặc theo băng ở những nơi có điều kiện thuận lợi.

Tùy theo địa hình của khu vực triển khai cũng như tính thẩm mỹ của mô hình mà chúng tôi đã chọn các loại hố có hình dạng khác nhau: hố hình tròn, hình vuông và hình chữ nhật. Khi cuốc, để phần đất tốt tơi xốp trên mặt và đất phía dưới hố riêng biệt. Lấp hố, đưa phần đất tốt (phần đất phía trên hố) xuống đáy hố cùng với thảm mục, có thể xới thêm phần đất mặt xung quanh hố để lấp đất gần ngang miệng hố.

Trước khi tiến hành trồng lan, chúng tôi đã bón lót phân NPK (tỷ lệ 5:10:3) với liều bón như sau: Khối lượng: 20 g/hố và 50 g phân vi sinh/hố. Nơi đất chua độ pH = 4.0 - 4.5, bón thêm 50 g vôi bột/hố.

Cách bón: kết hợp với lúc lấp hố. Phân được trộn đều với đất ở 1/3 phía dưới hố.

Thời điểm bón lót và lấp hố: trước khi trồng cây 7 - 10 ngày.

3.4.1.3. Tiêu chuẩn cây xuất vườn

a. Tiêu chuẩn cây xuất vườn đối với các loài thuộc chi Hoàng thảo

Tiêu chuẩn cây đem trồng: đồng đều về chiều cao, chiều cao trung bình cây mang trồng là từ 15 - 20 cm, lá cá kích thước trung bình 11 x 2.5 cm. Bên cạnh đó, các cây được chọn trồng ở mô hình đều đang trong giai đoạn phát triển mạnh và không bị sâu bệnh hại tấn công.

Hình 3.55. Cây Hoàng thảo trần kim khi xuất vườn.

Hình 3.56. Cây Hoàng thảo dẹt khi xuất vườn.

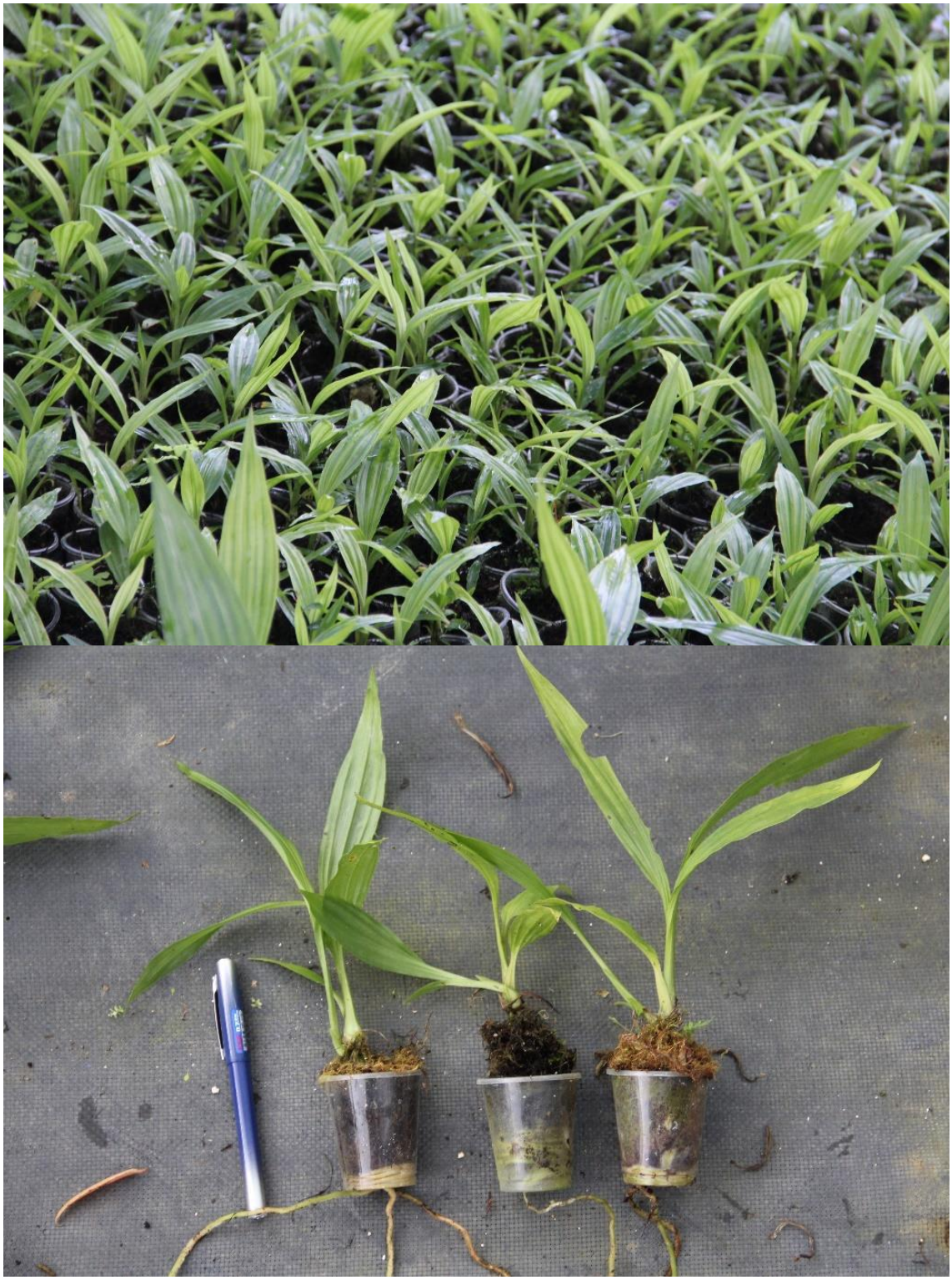
b. Tiêu chuẩn cây xuất vườn đối với loài Lan Hài vàng

Chọn những cây có từ 3 - 5 bụi, kích thước lá trung bình từ 22 - 25 x 3.2 - 3.5 cm, cây đang ở giai đoạn sinh trưởng mạnh, không bị sâu bệnh hại tấn công.

Hình 3.57. Cây Lan Hài vàng khi xuất vườn.

c. Tiêu chuẩn cây xuất vườn đối với các loài thuộc chi Hạc đính

Cây đồng đều về chiều cao, trung bình cây mang trồng từ 7 - 10 cm, lá có kích thước trung bình 18.3 x 3.2 cm. Bên cạnh đó, các cây được chọn trồng ở mô hình đều đang trong giai đoạn phát triển mạnh và không bị sâu bệnh hại tấn công.



Hình 3.58. Cây Hạc đính bảo lộc khi xuất vườn.

Hình 3.59. Cây Hạc đính nâu khi xuất vườn.

3.4.1.4. Bốc xếp vận chuyển và kỹ thuật trồng

Các loài lan trước khi đưa đi trồng sẽ được tưới nước đủ ẩm 1 đêm trước khi bốc xếp cây, tránh làm vỡ bầu, dập nát, gẫy ngọn trong quá trình bốc xếp và vận chuyển. Cây chuyển tới phải kịp thời trồng ngay, nếu chưa trồng phải xếp ở nơi râm mát và tưới nước đảm bảo độ ẩm cho bầu.

Đối với các loài Hoàng thảo dẹt và Hoàng thảo trần kim: bầu sau khi được xé bỏ sẽ được buộc cố định trên cây, sử dụng phân chậm tan nhằm cung cấp thêm chất dinh dưỡng cho sự phát triển của cây.

Đối với các loài Lan Hài vàng, Hạc đính: khi trồng cây phải xé bỏ vỏ bầu, đặt cây đứng thẳng, lấp đất sâu trên cổ rễ, ấn chặt đất xung quanh bầu và cổ rễ. Mặt đất quanh cổ rễ thấp hơn nền đất xung quanh 1.0 cm để giữ ẩm.

3.4.2. Kết quả xây dựng mô hình

3.4.2.1. Mô hình tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên

Tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, chúng tôi đã triển khai mô hình trên diện tích 500m^2 dưới vườn cây thực vật của Viện, đã triển khai số lượng 4.000 cây (500 cây Hoàng thảo trần kim, 1.000 cây Hoàng thảo dẹt, 1.000 cây Lan Hài vàng, 500 cây Hạc đính bảo lộc, 1.000 cây Hạc đính nâu).

Hình 3.60. Loài *Dendrobium trankimianum*.

Hình 3.61. Loài *Dendrobium trankimianum*.

Hình 3.62. Loài *Dendrobium nobile.*

Hình 3.63. Loài *Paphiopedilum villosum*.

Hình 3.64. Loài *Phaius baolocensis*.

Hình 3.65. Loài *Phaius tankervilleae*.

3.4.2.2. Mô hình tại Khu du lịch Hồ Tuyền Lâm

Địa điểm chọn để triển khai mô hình thuộc tiểu khu 157, nằm trong Khu du lịch thác Bảo Đại nhằm dễ dàng theo dõi và quản lý, đã triển khai số lượng 8.000 cây (500 cây Hoàng thảo trần kim, 3.000 cây Hoàng thảo dẹt, 2.000 cây Lan Hài vàng, 1.000 cây Hạc đính bảo lộc, 1.500 cây Hạc đính nâu).

Hình 3.66. Loài *Dendrobium trankimianum*.

Hình 3.67. Loài *Dendrobium nobile*.

Hình 3.68. Loài *Paphiopedilum villosum*.

Hình 3.69. Loài *Phaius baolocensis* và loài *Phaius tankervilleae*

3.4.2.3. Mô hình tại Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà

Địa điểm chọn để triển khai mô hình thuộc tiểu khu 91, nằm ngay trung tâm Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà, đã triển khai số lượng 8.000 cây (500 cây Hoàng thảo trần kim, 5.100 cây Hoàng thảo dẹt, 1.000 cây Lan Hài vàng, 700 cây Hạc đính bảo lộc, 700 cây Hạc đính nâu).

Hình 3.70. Loài *Dendrobium trankimianum*.

Hình 3.71. Loài *Dendrobium nobile.*

Hình 3.72. Loài *Paphiopedilum villosum*.

Hình 3.73. Loài *Phaius baolocensis* và loài *Phaius tankervilleae*.

Hình 3.74. Vườn thực nghiệm Bidoup - Núi Bà.

ĐỀ XUẤT MÔ HÌNH TRỒNG LAN BÁN HOANG DÃ

Từ kết quả 3 mô hình thử nghiệm chúng tôi đề xuất mô hình cho trồng lan bán hoang dã như sau:

Rừng rậm nhiệt đới thường xanh mưa mùa

Kiểu rừng này có đặc điểm sinh học nổi bật là chồi cây gỗ phần lớn được bao bởi vẩy chồi. Khí hậu có hai mùa rõ rệt là mùa khô và mùa mưa luân phiên nhau, chiếm một diện tích lớn ở Tây Nguyên trên các loại đất khác nhau. Nhưng do sự khai thác của con người vì nhiều mục đích khác nhau nên đại bộ phận diện tích đã bị thay thế bởi các thảm thực vật thứ sinh khác nhau.

Kiểu rừng này tồn tại ở ba độ cao khác nhau từ thấp lên cao và thành phần loài, cấu trúc và đặc tính sinh học của rừng cũng thay đổi rõ rệt.

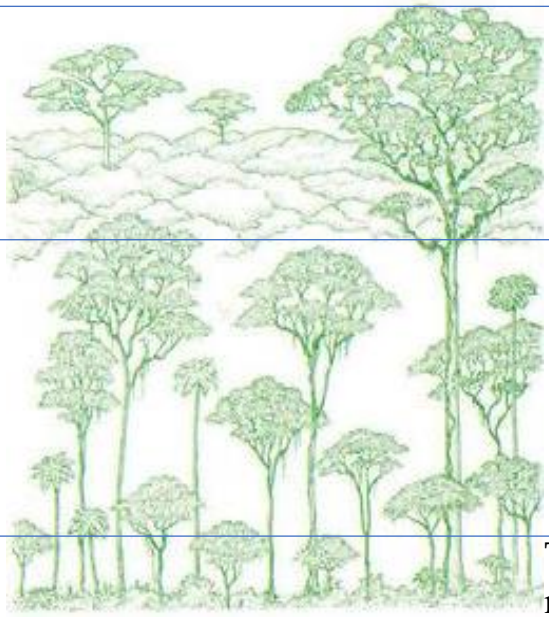
a) Ở địa hình núi thấp: loại rừng này phát triển ở đai độ cao từ 600 - 1.600 m. Có sự thay đổi dần thành phần cây gỗ theo độ cao, càng lên cao càng nhiều các đại diện các họ Dẻ Fagaceae, Long não Lauraceae và đại diện các họ khác giảm bớt dần như: họ Dầu Dipterocarpaceae, họ Xoan Meliaceae, họ Đào lộn hột Anacardiaceae, họ Đậu Fabaceae ...

Tầng vượt tán biến mất dần, rừng chỉ còn có 2 tầng cây gỗ là tầng ưu thế sinh thái và tầng dưới tán rừng. Trong kiểu rừng này nhiều thực vật bì sinh thuộc Dương xỉ và họ Lan.

b) Ở núi trung bình: Rừng phân bố chủ yếu trên các sườn, đường đỉnh, đỉnh núi từ đai độ cao 1.600 m đến đỉnh núi cao (Chư Yang Sin, Bidoup). Nét đặc trưng tầng cây gỗ là thân ngắn, phân cành thấp, tạo nên kiểu rừng thấp, rừng nhiều sương mù.

Thực vật bì sinh rất phong phú gồm các loài: Rêu, Địa y, các loài Dương xỉ… chúng bao kín thành lớp dày xung quanh thân và cành cây gỗ, tạo điều kiện tốt cho sự hiện diện của các loài lan.

Trên đây là kiểu rừng thích hợp cho việc triển khai mô trồng lan bán hoang dã.



Hình 3.75. Mô hình trồng lan bán hoang dã.

MỘT SỐ HÌNH ẢNH VỀ BỆNH THƯỜNG GẶP

Hình 3.76. Bệnh trên loài Hoàng thảo trần kim và Hoàng thảo dẹt.

Hình 3.77. Bệnh trên loài Lan Hài vàng.

Hình 3.78. Bệnh trên loài Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

4.1.1. Điều tra hiện trạng địa điểm xây dựng mô hình; thu thập, khảo sát một số đặc điểm sinh thái học của 05 loài Lan *(Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis* và *Phaius tankervilleae).*

Đã xác định được cấu trúc thảm thực vật, điều kiện khí hậu, thổ nhưỡng ở 3 địa điểm triển khai mô hình là Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Khu du lịch Hồ Tuyền Lâm và Vườn Quốc gia bidoup - Núi Bà

Đã thu thập mẫu vật và xác định được đặc điểm hình thái, sinh thái, phân bố, hiện trạng và giá trị sử dụng của 5 loài Lan *Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum, Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis* và *Phaius tankervilleae.*

Đã phát hiện một loài mới có tên khoa học *Bulbophyllum sonii* Aver. & N.V.Duy tại khu vực núi Bidoup và công bố trên tạp chí Phytotaxa 369 (1): 001 - 014. 2018.

4.1.2. Kết quả nhân giống

4.1.2.1. Nhân giống sinh dưỡng

a. Hoàng thảo dẹt và Hoàng thảo trần kim

Sử dụng phương pháp ươm kie và xử lý ở nồng độ 0.5 mg/l IBA đối với Hoàng thảo dẹt và 1.0 mg/l IBA là thích hợp đối với Hoàng thảo trần kim.

b. Lan Hài vàng

Sử dụng phương pháp tách cây để tiến hành nhân giống loài Lan Hài vàng.

c. Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu

Sử dụng phương pháp tách củ và ươm cuống hoa để tiến hành nhân giống hai loài Hạc đính.

4.1.2.2. Nhân giống in vitro

Đã tiến hành nhân giống được 25.000 cây thuộc 5 loài với số lượng cụ thể như sau:

Hoàng thảo dẹt: 12.000 cây

Hoàng thảo trần kim: 2.000 cây

Lan Hài vàng: 5.000 cây

Hạc đính bảo lộc: 2.500 cây

Hạc đính nâu: 3.500 cây.

Sử dụng Streptomycine 2‰ 5 phút + $HgCl_2$ 1‰ (vài giọt Tween 80) 8 phút được chọn để khử trùng các chồi ngủ. Mẫu sau khi khử trùng được cấy trên môi trường ½MS có bổ sung 0.1 mg/l NAA; 1.0 mg/l BA nhằm tạo nguồn mẫu trong nuôi cấy *in vitro.*

a. Hoàng thảo trần kim

Môi trường thích hợp tạo PLB là môi trường MS bổ sung 15% nước dừa, 2.0 mg/l BA hoặc 2.0 mg/l BA kết hợp 0.5 mg/l NAA hay 1.5 mg/l TDZ kết hợp 0.5 mg/l NAA.

Môi trường thích hợp tạo chồi là môi trường MS bổ sung 15% nước dừa, 1.5 mg/l BA hoặc bổ sung 60 g chuối chín/l môi trường.

Môi trường ra rễ tối ưu là môi trường ½MS bổ sung 1.0 g/l than hoạt tính, 15% nước dừa và 0.5 mg/l NAA.

b. Hoàng thảo dẹt

Môi trường thích hợp tạo PLB là môi trường MS bổ sung 15% nước dừa, 2.0 mg/l BA hoặc 2.0 mg/l BA kết hợp 0.5 mg/l NAA hay 1.5 mg/l TDZ kết hợp 0.5 mg/l NAA.

Môi trường thích hợp tạo chồi là môi trường MS bổ sung 15% nước dừa, 1.5 mg/l BA hoặc 1.0 mg/l Kin hay bổ sung 100 g chuối chín/l môi trường.

Môi trường ra rễ tối ưu là môi trường ½MS bổ sung 1.0 g/l than hoạt tính, 15% nước dừa và 1.0 mg/l IBA.

c. Lan Hài vàng

Môi trường ½MS là môi trường gieo hạt thích hợp cho quả lan 7 - 8 tháng tuổi.

Môi trường thích hợp tạo chồi là môi trường MS bổ sung 15% nước dừa và 60 g chuối chín/l môi trường.

Môi trường ra rễ tối ưu là môi trường ½MS bổ sung 1.0 g/l than hoạt tính, 15% nước dừa và 1.0 mg/l NAA.

d. Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu.

Môi trường thích hợp tạo PLB của Hạc đính bảo lộc là môi trường MS bổ sung 15% nước dừa, 1.0 mg/l BA.

Môi trường thích hợp tạo PLB của Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu là môi trường MS bổ sung 15% nước dừa, 1.0 mg/l BA kết hợp 1.0 mg/l NAA hoặc 1.5 mg/l TDZ kết hợp 0.5 mg/l NAA.

Môi trường thích hợp tạo chồi Hạc đính bảo lộc là môi trường MS bổ sung 15% nước dừa, 1.0 mg/l BA hoặc 0.5 mg/l Kin.

Môi trường thích hợp tạo chồi Hạc đính nâu là môi trường MS bổ sung 15% nước dừa, 1.0 mg/l BA hoặc 1.0 mg/l Kin.

Môi trường thích hợp tạo chồi của cả Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu là môi trường MS bổ sung 15% nước dừa và 100 g chuối chín/l môi trường.

Môi trường ra rễ tối ưu cho Hạc đính bảo lộc và Hạc đính nâu là môi trường ½MS bổ sung 1.0 g/l than hoạt tính, 15% nước dừa và 0.5 mg/l NAA.

4.1.3. Nghiên cứu quy trình chăm sóc cây con sau ống nghiệm và các biện pháp kỹ thuật chăm sóc cây trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện tự nhiên

Qua các kết quả nghiên cứu nội nghiệp và ngoại nghiệp chúng tôi đã xây dựng được các nhóm quy trình sau:

Quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con *Dendrobium nobile* và *Dendrobium trankimianum* sau ống nghiệm.

Quy trình kỹ thuật chăm sóc cây con *Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis* và *Phaius tankervilleae* sau ống nghiệm.

Quy trình kỹ thuật chăm sóc cây *Dendrobium nobile, Dendrobium trankimianum* trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã, tán rừng tự nhiên.

Quy trình kỹ thuật chăm sóc cây *Paphiopedilum villosum, Phaius baolocensis* và *Phaius tankervilleae* trưởng thành về khả năng thích nghi với điều kiện bán hoang dã, tán rừng tự nhiên.

4.1.4. Mô hình trồng lan bán hoang dã

Đã xác định được địa điểm xây dựng mô hình và triển khai mô hình trồng lan bán hoang dã tại 3 địa điểm như sau:

Mô hình 1: Triển khai tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên diện tích trên 500m^2 dưới tán cây của vườn thực vật, số lượng 4.000 cây (500 cây Hoàng thảo trần kim, 1.000 cây Hoàng thảo dẹt, 1.000 cây Lan Hài vàng, 500 cây Hạc đính bảo lộc, 1.000 cây Hạc đính nâu).

Mô hình 2: Triển khai tại tiểu khu 157 nằm trong Khu du lịch thác Bảo Đại diện tích trên 1.000m^2 dưới tán rừng cây lá rộng, số lượng 8.000 cây (500 cây Hoàng thảo trần kim, 3.000 cây Hoàng thảo dẹt, 2.000 cây Lan Hài vàng, 1.000 cây Hạc đính bảo lộc, 1.500 cây Hạc đính nâu).

Mô hình 3: Triển khai tại tiểu khu 91 thuộc Vườn Quốc gia Bidoup - Núi Bà, diện tích trên 1.000m^2 dưới tán rừng cây lá rộng và lá kim, số lượng 8.000 cây (500 cây Hoàng thảo trần kim, 5.100 cây Hoàng thảo dẹt, 1.000 cây Lan Hài vàng, 700 cây Hạc đính bảo lộc, 700 cây Hạc đính nâu).

Sau một năm triển khai và theo dõi, đến mùa sinh trưởng (*mùa mưa*) tất cả các loài đều sinh trưởng và phát triển tốt, thích nghi với điều kiện tự nhiên. Các mô hình hoàn toàn có điều kiện phát triển mở rộng cho nhiều vùng ở Tây Nguyên,

chẳng những có thể bù đắp các thiếu hụt do khai thác quá mức nguồn tài nguyên họ Lan mà còn tạo điều kiện cho phát triển thành mặt hàng xuất khẩu có giá trị.

4.2. Kiến nghị

Từ các kết quả của quá trình nghiên cứu chúng tôi có những kiến nghị như sau:

- Tiếp tục theo dõi sự sinh trưởng và phát triển cũng như bảo vệ các loài Lan đã đưa ra trồng bán hoang dã ở các điểm đã triển khai và nhân rộng mô hình để phục vụ tham quan du lịch.

- Tiếp tục triển khai các biện pháp bảo tồn và nhân giống với số lượng lớn các loài lan rừng đặc hữu, quý hiếm, có giá trị kinh tế và sử dụng bền vững.

- Cần nghiên cứu xây dựng cơ sở dữ liệu về DNA của các loài Lan, đặc biệt là đối với các loài đặc hữu, quý hiếm và có giá trị kinh tế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

I. Tài liệu tiếng Việt

1. Averyanov LV. 2003. *Trích yếu được cập nhật hóa về các loài Lan Việt Nam*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.
2. Averyanov LV, Phillip C, Phan Kế Lộc và Nguyễn Tiến Hiệp. 2004. *Lan Hài Việt Nam.* Nhà xuất bản Giao thông Vận tải.
3. Nguyễn Tiến Bân và cộng sự. 1984. *Danh lục thực vật Tây Nguyên*. Hà Nội.
4. Nguyễn Tiến Bân. 1997. *Cẩm nang tra cứu và nhận biết các họ thực vật hạt kín*. Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội.
5. Nguyễn Tiến Bân chủ biên. 2005. Danh lục các loài thực vật Việt Nam, tập III.
6. Nguyễn Tiến Bân và cộng sự. 2007. *Sách đỏ Việt Nam, Phần Thực vật*. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật Hà Nội.
7. Lê Trần Bình, Hồ Hữu Nhị và Lê Thị Muội. 2002. *Công nghệ sinh học thực vật trong cải tiến giống cây trồng*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
8. Nguyễn Thị Cúc, Nguyễn Văn Kết, Dương Tấn Nhựt và Nguyễn Thị Kim Thúy. 2014. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số hợp chất hữu cơ lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây lan Hài hồng (*Paphiopedilum delenatii*) *in vitro*. *Tạp chí Sinh học*. 36(1se): 250 - 256.
9. Võ Văn Chi. 1997. *Từ điển cây thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
10. Võ Văn Chi và Dương Đức Tiến. 1978. *Phân loại học Thực vật bậc cao*. Nhà xuất bản Đại học và Trung học chuyên nghiệp Hà Nội.
11. Nông Văn Duy. 2008. *Báo cáo Tổng kết đề tài cấp Tỉnh*.
12. Nông Văn Duy. 2016. *Báo cáo Tổng hợp Kết quả Khoa học Công nghệ đề tài*: Điều tra họ Lan (Orchidaceae Juss.) tại Tây Nguyên, nghiên cứu các cơ sở khoa học để bảo tồn, phát triển, sử dụng có hiệu quả và bền vững.
13. Hoàng Thị Giang, Nguyễn Quang Thạch, Mạch Hồng Thắm và Đỗ Thị Thu Hà. 2010. Nghiên cứu nhân giống *in vitro* và nuôi trồng giống lan hài quý *P. hangianum* perner Gurss (Hài Hăng) thu thập ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*. 8(2): 194 - 201.
14. Phạm Hoàng Hộ.1993. *Cây cỏ miền Nam Việt Nam* quyển III tập 2. Montreal.
15. Phạm Hoàng Hộ. 2000. *Cây cỏ miền Nam Việt Nam* quyển III. Nhà xuất bản Trẻ.
16. Trần Hợp. 2000. *Phong lan Việt Nam*. Nhà xuất bản khoa học kỹ thuật.

17. Trần Văn Huân, Văn Tích Lượm. 2002. *Kỹ thuật nuôi trồng cây lan*. Nhà xuất bản Thành phố Hồ Chí Minh.

18. Phan Xuân Huyên, Hoàng Văn Cương và Nguyễn Thị Phượng Hoàng. 2015. Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây hoa lan *Miltonia* sp. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam* 7: 1128.

19. Dương Đức Huyến. 2007. *Thực vật chí Việt Nam*, tập 9, họ lan (Ochidaceae Juss.). Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.

20. Dương Công Kiên. 2002. *Nuôi cấy mô thực vật*, tập 2. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp HCM.

21. Vũ Ngọc Lan và 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.

22. Trần Đình Lý. 1993. *1.900 loài cây có ích ở Việt Nam*. Nhà xuất bản Thế Giới Hà Nội.

23. Trần Văn Minh, Nguyễn Văn Uyển. 2001. Vi nhân giống phong lan nhóm *Dendrobium* trên quy mô công nghiệp, nhân giống *in vitro. Tạp chí Khoa học Công nghệ* 01: 1 - 9.

24. Lê Thanh Nhuận, Phạm Thị Liên, Nguyễn Trung Hưng và các cộng sự. 2009. *Chuyên đề nghiên cứu ảnh hưởng chế độ dinh dưỡng tới khả năng sinh trưởng, phát triển của lan Hoàng Thảo tại miền Bắc Việt Nam*. Nhà xuất bản Viện Di truyền Nông nghiệp, Hà Nội.

25. Nguyễn Xuân Quát. 1985. *Thông nhựa ở Việt Nam - Yêu cầu chất lượng cây con và hỗn hợp ruột bầu ươm cây để trồng rừng*. Tóm tắt luận án Phó Tiến sĩ khoa học nông nghiệp. Viện khoa học lâm nghiệp Việt Nam.

26. Nguyễn Văn Song, Phan Hùng Vĩnh và Trương Thị Bích Phượng. 2013. Nhân nhanh *in vitro* lan kim điệp (*Dendrobium chrysotoxum*) - một loài lan rừng có nguy cơ tuyệt chủng. *Hue University Journal of Science (HU JOS)* 64(1).

27. Nguyễn Thị Sơn, Nguyễn Thị Lý Anh, Vũ Ngọc Lan, Trần Thế Mai. 2012. Nhân giống *in vitro* loài lan *Dendrobium Fimbriatum* Hook. (Hoàng thảo long nhãn). *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 10(2): 263 - 271.

28. Nguyễn Thị Sơn, Từ Bích Thủy, Đặng Thị Nhàn, Nguyễn Thị Lý Anh, Hoàng Thị Nga và Nguyễn Quang Thạch. 2014. Nhân giống *in vitro* lan *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (Dẹt Thiết Bì). *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 12(8): 1274 - 1282.

29. 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. 2018. Vi nhân giống lan Nhất điểm hoàng (*Dendrobium heterocarpum* Lindl.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học.* 16(1): 127 - 135.

30. Phạm Chí Thanh. 1998. *Giáo trình phương pháp thí nghiệm đồng ruộng*. Nhà xuất bản Nông nghiệp.

31. Nguyễn Văn Thêm. 2002. *Sinh thái rừng*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Chi nhánh Tp. Hồ Chí Minh.

32. Nguyễn Văn Thêm. 2003. *Phân tích các thí nghiệm gieo ươm cây gỗ dựa trên nhiều biến phản hồi*. Tạp chí KHKT. Nông lâm nghiệp. Tủ sách Trường Đại học Nông lâm Tp. Hồ Chí Minh.

33. Bùi Thị Tường Thu, Trần Văn Minh. 2007. Ảnh hưởng của các chất điều hoà sinh trưởng đến quá trình nuôi cấy phát sinh tế bào soma và phôi vô tính ở cây hoa lan *(Dedrobium, Phalaenopsis, Cymbidium). Kỷ yếu Hội nghị khoa học và công nghệ Viện Sinh học Nhiệt đới*. 504 - 509.

34. Nguyễn Thanh Tùng, Lê Văn Điệp, Nguyễn Minh Trung và Trương Thị Bích Phượng. 2010. Áp dụng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào trong nhân giống *in vitro* cây lan Hoàng thảo thân gãy (*Dendrobium aduncum*). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 8(3): 361 - 367.

35. Đỗ Năng Vịnh. 2002. *Công nghệ sinh học cây trồng*. Nhà xuất bản Nông nghiệp.

36. Kha Nữ Tú Uyên, Nguyễn Thị Hồng Tú, Vương Thị Hồng Loan, Nguyễn Thị Điệp và Phạm Đình Dũng. 2015. Khảo sát khả năng phát sinh protocorms like bodies trực tiếp từ phát hoa cây lan *Renanthera* sp. *Tạp chí Khoa học ĐHSP TPHCM*. 12(78): 161 - 169.

II. Tài liệu tiếng nước ngoài

37. Arditti J. 2009. *Micropropagation of orchids*. John Wiley & Sons.

38. Averyanov LV & Huyen Duc Duong. 1989. Rare species of the genus *Dendrobium* (Orchidaceae) in Vietnamese flora. *Bot. J. (Leningrad)*. 74(11): 1667 - 1668. (in Russian).

39. Averyanov LV. 1994. *Identification guide to Vietnamese orchids* (Orchidaceae Juss.). St. Petersburg, World & Family. 432 pp. (in Russian).

40. Averyanov LV, Phillip C, Phan Ke Loc & Nguyen Tien Hiep. 2004. *Lan Hai Viet Nam*. Nha Xuat Ban Giao Thong Van Tai.

41. Averyanov LV, Ponert J, Nguyen PT, Nong VD, Nguyen SK, Nguyen VC. 2016. A survey of *Dendrobium* Sw. sect. Formosae (Benth. & Hook. f.) Hook. f. in Cambodia, Laos and Vietnam. *Adansonia*. 38(2): 199 - 217.

42. Babu KN, Sajina A, Minoo D, John CZ, Mini PM, Tushar KV, Rema J, Ravindran PN. 2003. Micropropagation of camphor tree (*Cinnamomum camphora*). *Plant Cell Tiss Org Cult.* 74: 179 - 183.

43. Bijaya P, Sumitra S. 2011. *In vitro* Mass Propagation of a Ground Orchid - Phaius tancarvilleae (L′Her.) Blume through Shoot Tip Culture. *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 21(2): 181 - 188.

44. Bijaya P, Sumitra S, Shreeti P. 2011. *In vitro* seed germination and seedling devlopment of *Phaius tancarvilleae* (L' her.) Blume. *Scientific World*. 9(9): 50 - 52.

45. Bubeck SK. 1973. *A study of Paphiopedilum meristem culture.*, in Rutgers University Microfilm International, Ann Arbor, Mivhigan, The USA.p. 109.

46. Chen JT, Chang C and Chang WC. 1999. Direct somatic embryogenesis from the leaf explant of Oncidium 'Grower Ramsay' and subsequent plant regeneration. *Plant Cell Rep.* 19: 143 - 149.

47. Churchill ME, Arditti J, and Ball EA. 1971. Clonal propagation of orchids from leaf tips. *Am. Orchid Soc. Bull*. 40: 109 - 113.

48. Churchill ME, Ball EA, and Arditti J. 1973. Tissus culture of orchids. Methods for leaf tips. *New Phytol.* 72: 161 - 162.

49. Chyuam YN and SalehNM. 2011. *In vitro* propagation of Paphiopedilum orchid through formation of protocorms - like bodies. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 105: 193 - 202.

50. Comb Mc. 1978. Clonal propagation of woody plant species with special reference to apples. *Proc. Int. Plant Propag. Soc*. 28: 413 - 426.

51. Dake Z, Guangwan H, Zhiying C, Yana S, Li Z, Anjun T and Chunlin L. 2013. "Micropropagation and *in vitro* flowering of *Dendrobium wangliangii:* A critically endangered medicinal orchid". *J. Med. Plants Res.* 7(28): 2098 - 2110

52. Deb C and Imchen T. 2010. An Efficient *in vitro* Hardening Technique of Tissue Culture Raised Plants. *Biotechnology*. 9(1): 79 - 83.

53. Duangnapa N, Sumay A, Kanjana S. 2012. Effect of basic medium and plant growth regulators on *in vitro* multiplication of *Phaius tancarvillae* (Banks ex L'Heritier de Brutelle) Blume. *Journal of Agricultural Technology*. 8(5): 1761 - 1768.

54. Ernst R. 1975. Studies in asymbiotic culture of orchids. *Am Orchid Soc Bull* 44: 12 - 18.

55. Gilberto BK, Maria EME. 1996. Formation of protocorms-like bodies from sliced root apexes of *Clowesia warscewiczii*. *R.Bras.Fisiol.Veg*. 8(2): 157 - 159.

56. Hossain MM. 2013. *In vitro* Embryo Morphogenesis and Micropropagation of *Dendrobium aggregatum* Roxb. *Plant Tissue Cult & Biotech* 23(2): 241 - 249.

57. Hossain MM, Sharma M, Silva JAT, Pathak P. 2010. Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. *Sci Hort* 123(4): 479 - 487.

58. Huang LC. 1988. A procedure for asexual multiplication of *Paphiopedilum in vitro. Amer. Orc Soc Bull*. 57: 274 - 278.

59. Islam MO, Matsui S, Ichihashi S. 2000. Effect of complex organic additives on seed germination and carotenoid content in *Cattleya* seedlings. *Lindleyana.* 15(2): 81 - 88.

60. Kabir MF, Rahman MS, Jamal A, Rahman M and Khalekuzzaman M. 2013. Multiple shoot regeneration in *Dendrobium fimbriatum* Hook an ornamental orchid. *J Anim Plant Sci*. 23(4): 1140 - 1145.

61. Kanjilal B, De Sarker D, Mitra J, Datta KB. 1999. Stem disc culture: development of a rapid mass propagation method for *Dendrobium moschatum* (Buch. - Ham.) Swartz - an endangered orchid. *Curr Sci.* 77(4): 497 - 500.

62. Kimmins JP. 1998. Forest ecology. Prentice - Hall, Upper Saddle River, New Jersey.

63. Knudson L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seed. *Am. Orch. Soc. Bull.* 15: 214 - 217.

64. Koravisd N. 2011. Effects of NAA, amino acids and sucrose on growth of *in vitro* culture of wild orchid, *Dendrobium chrysanthum* Lindl., 37th Congress on Science and Technology of Thailand, 10 - 12 October, 2011.

65. Li- Chun H, Lin CJ, Kou CI, Huang BL and Murashige T. 2001. Paphiopedilum cloning *in vitro. Sci Hort*. 91: 111 - 121.

66. Lin YH, Chang C and Chang WC. 2000. Plant regeneration from callus culture of a Paphiopedilum hybrid. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 62: 21 - 5.

67. Luan VQ, Nguyen QT, Dinh VK and Duong TN. 2006. *In vitro* germination capacity and plant recovery of some native and rare orchids. in *Proceeding of International Workshop on Biotechnology in Agriculture*.

68. Luo JP, Ying W, Zha XQ and Huang L. 2008. Micropropagation of *Dendrobium densiflorum* Lindl. ex Wall. through protocorms - like bodies: effects of plant growth regulators and lanthanoids. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 93: 333 - 340

69. Malabadi BR, Gangadhar SM and Nataraja K. 2004. Micropropagation of *Dendrobium nobile* from shoot tip sections. *J Plant Physiol.* 162: 473 - 478.

70. Morel GM. 1960. Producing virus-free Cymbidium. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 29: 495 - 497.

71. Morel G. 1974. *Clonal multiplication of orchid*. In: Withner CL, ed. The orchid. Scientific studies. New York: Wiley Interscience.

72. Mok MC, Mok DWS, Armstrong DJ, Shudo K, Isogai Y, Okamoto T. 1982. Cytokinin activity of N-phenyl-N′-1, 2,3-thiadiazol-5-ylurea (Thidiazuron). *Phytochemistry*. 21(7): 1509 - 1511.

73. Murthy SDS, Mohanty P. 1995. Action of selected heavy metal ions on the photosystem 2 activity of the cyanobacterium Spirulina platensis. *Biologia plantarum*. 37(1): 79.

74. Nayak NR, Rath SP, Patnaik SN. 1997. *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thiadizuron-induced high frequency shoot proliferation. *Sci. Hortic*. 71: 243 - 250.

75. Nhut DT, Thuy DTT, Luan VQ, Don NT, Khiem DV and Tran Thanh Van K. 2005. Micropropagation of *Paphiopedilum delenatii* via stem nodeculture. *Vietnam - Korea International Symposium, Bio-Technology & BioSystem Engineering*: 184 - 190.

76. Nihar RN, Susmita S, Satyanarayan P, Shiba PR. 2002. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae)

77. Niramol R. 2009. Micropropagation of *Dendrobium draconis* Rchb. f. from thin cross - section culture. *Sci Hort.* 122(4): 662 - 665.

78. Nong VD, Chen T & Zhang DX. 2012. *Phaius baolocensis* sp. nov. (Orchidaceae), a new species endemic to southern highlands of Vietnam. *Adansonia* sér 3. 34(2): 251 - 255.

79. Parasad GVS, Subba RIV, Veera RP. 2001. *In vitro* propagation of orchid *Dendrobium sonia. Indian J Plant physiol.* 6: 284 - 288.

80. Patcharawadee W, Eric B, Kongkanda C and Sureeya T. 2011. Effect of Cytokinins (BAP and TDZ) and Auxin (2,4-D) on Growth and Development of *Paphiopedilum callosum*. *Kas Jour - Nat Sci.* 45: 12 - 19.

81. Paromik B, Suman K, Reemavareen D, Pramod T. 2014. Genetic stability and phytochemical analysis of the *in vitro* regenerated plants of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid. *Meta Gene.* 2: 489 - 504.

82. Puangpaka S, Sarinee C, Matura S, Maleeya K. 2001. *In vitro* studies on the effect of light intensity on plant growth of *Phaius tankervilliae* (Banks ex L' Herit.) Bl. and Vanda coerulea Griff. *Sci. Asia*. 27: 233 - 237.

83. Rayle DL, Ross CW, Robinson N. 1982. Estimation of osmotic parameters accompanying zeatin - induced growth of detached cucumber cotyledons. *Plant Physiol*. 70: 1634 - 1636.

84. Rao S and Barman B. 2014. *In vitro* micropropagation of *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl. - a threatened orchid. *Sch Acad J Biosci*. 2(1): 39 - 42.

85. Ricardo T de F, Fabiana NR, Luciana VRO, Cláudio M (2004) *In vitro Dendrobium nobile* plant growthand rooting in different sucrose concentrations. *Hortic Bras*. 22(4).

86. Rocky T, Soumen M, Sachin S. 2017. *In vitro* mass propagation of endangered terrestrial orchid *Phaius tankervilliae* (L'Her.) Blume through green seed pod culture. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 6(5): 722 - 728.

87. Sultana N, Jahan TA, Barai TK, Akhter MS, Ara. N. 2012. Tissue culture propagation of tropical orchid (*Phaius tankervilliae*) plant. *J. Innov. Dev. Strategy*. 6(1): 81 - 85.

88. Sana A, Touqeer A, Ishfaq AH, Mehwish Y. 2011. *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var Emma white. *Afr. J. Biotechnol*. 10(16): 3097 - 3103.

89. Shu FL, Satish MN, Chao LK, Chung LC, Hsin ST. 2004. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* makino - a medicinally important orchild. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 40(5): 528 - 535.

90. Somporn P, Rosemina A. 2009. Effect of additive substances and planting substrate on growth development of *Aerides houlletiana* rchb. f. seedling by tissue culture. *KKU Science Journal*. 37(3): 320 - 324.

91. Songjun Z, Jia W, Kunlin W, Jaime ATDS, Jianxia Z and Jun D. 2013. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum hangianum* Perner & Gruss. *Sci. Hort.* 151: 147 - 156.

92. Stewart J and Button J. 1975. Tissue culture studies in *Paphiopedilum*. *American Orchid Society Bulletin*. 44: 591 - 599.

93. Sunitibala H, Kishor R. 2009. Micropropagation of *Dendrobium transparens* L. from axenic pseudobulb segments. *Ind. J. Biotech.* 08: 448 - 452.

94. Sultana N, Jahan TA, Barai TK, Akhter MS, Ara. N. 2012. Tissue culture propagation of tropical orchid (*Phaius tankervilliae*) plant. *J. Innov. Dev. Strategy* 6(1): 81 - 85.

95. Sutter E, Langhans RW. 1979. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 104: 493 - 496.

96. Ting YC, Jen TC and Wei CC. 2001. Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *Paphiopedilum* orchids. *Plant Cell. Rep.* 76: 11 - 15.

97. Tokuhara K, Mii M. 1993. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell. Rep.* 13(1): 7 - 11.

98. Van ST, Stewart J. 1975. Cytokinins in banana fruit. *Zpflanzenphysiol*. 76: 280 - 283.

99. Vijayakumar S, Rajalkshmi G, Kalimuthu K. 2012. Propagation of *Dendrobium aggregatum* by green capsule culture. *Lankesteriana International Journal on Orchidology*. 12(2): 131 - 135.

100. Zimmerman RH, Broome OC. 1981. Phloroglucinol and *in vitro* rooting of apple cultivar cuttings. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 35: 648 - 652.