

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**

**TRẦN NGỌC NAM**

**NGHIÊN CỨU HOÀN THIỆN QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG  
*IN VITRO* LAN HOÀNG THẢO THẠCH HỘC TÍA  
(*DEDROBIUM NOBILE LINDL*)**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG**

**Thái Nguyên - 2018**

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**  
**TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**

**TRẦN NGỌC NAM**

**NGHIÊN CỨU HOÀN THIỆN QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG  
*IN VITRO* LAN HOÀNG THẢO THẠCH HỘC TÍA  
(*DEDROBIUM NOBILE LINDL*)**

**Chuyên ngành: Công nghệ sinh học**

**Mã số: 60.42.02.01**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC**

**TS. NGUYỄN THỊ HẢI YẾN**

**Thái Nguyên - 2018**

## LỜI CẢM ƠN

Đầu tiên tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc nhất tới TS. Nguyễn Thị Hải Yến giảng viên Khoa Công nghệ sinh học đã rất nhiệt tình hướng dẫn và giúp đỡ tôi hoàn thành luận văn.

Tôi xin cảm ơn các thầy, cô giáo và các cán bộ Phòng thí nghiệm sinh học Khoa Công nghệ sinh học đã tạo điều kiện về thời gian cũng như cơ sở vật chất cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu để hoàn thành đề tài này.

Cuối cùng tôi xin cảm ơn gia đình, bạn bè cùng tất cả các thầy cô luôn luôn động viên, khuyến khích và giúp đỡ tôi trong tiến trình tôi học tập và làm đề tài.

*Thái Nguyên, ngày ... tháng ... năm 2018*

**Học Viên**

**Trần Ngọc Nam**

## MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN.....	i
MỤC LỤC .....	ii
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	iv
DANH MỤC CÁC HÌNH .....	v
DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT VÀ KÝ HIỆU .....	vi
MỞ ĐẦU .....	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. GIỚI THIỆU CHUNG VỀ PHONG LAN .....	3
1.1.1. Phân loại và nguồn gốc .....	3
1.1.2. Chi lan Hoàng thảo (Dendrobium).....	4
1.2. MỘT SỐ LOÀI LAN DENDROBIUM DÙNG LÀM THUỐC.....	7
1.2.1. Lan Thạch hộc.....	7
1.2.2. Hoàng thảo ngọc trúc - Dendrobium moniliforme.....	9
1.2.3. Dendrobium officinale .....	9
1.2.4. Các Dendrobium khác.....	10
1.3. GIÁ TRỊ DƯỢC LIỆU CỦA LAN THẠCH HỘC.....	10
1.3.1. Đặc điểm thực vật học.....	10
1.3.2. Thu hái và chế biến .....	11
1.3.3. Công dụng và thành phần hóa học .....	12
1.3.4. Các vị thuốc chứa thạch hộc .....	13
1.4. MỘT SỐ NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG <i>IN VITRO</i> LAN DENDROBIUM.....	16
1.4.1. Một số nghiên cứu trên thế giới .....	16
1.4.2. Một số nghiên cứu tại Việt Nam .....	17
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	19
2.1. VẬT LIỆU .....	19
2.1.1. Vật liệu thực vật.....	19
2.1.2. Dụng cụ và hóa chất.....	19
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	20
2.2.1. Thu và xử lý mẫu .....	20
2.2.2. Khử trùng mẫu hạt đưa vào nuôi cấy .....	20
2.2.3. Môi trường nuôi cấy.....	20

2.2.4. Bố trí thí nghiệm .....	21
2.2.5. Điều kiện nuôi cấy .....	22
2.2.6. Các chỉ tiêu đánh giá .....	22
2.2.7. Xử lý số liệu .....	22
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	23
3.1. KẾT QUẢ KHỬ TRÙNG MẪU.....	23
3.2. KẾT QUẢ TÁI SINH TẠO PROTOCORM .....	25
3.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng tăng sinh protocorm .....	25
3.2.2. Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến quá trình nhân nhanh protocorm	26
3.2.3. Ảnh hưởng của nước dừa đến quá trình phát sinh chồi protocorm.....	28
3.2.4. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng phát sinh chồi từ protocorm .....	29
3.3. KẾT QUẢ NHÂN NHANH VÀ TẠO CÂY HOÀN CHỈNH <i>IN VITRO</i> .....	31
3.3.1. Ảnh hưởng của BAP đến sự nhân nhanh chồi lan Thạch học .....	31
3.3.2. Ảnh hưởng của hàm lượng khoai tây và chuối xanh nghiền đến sự phát triển chồi lan Thạch học .....	33
3.3.3. Ảnh hưởng của $\alpha$ – NAA đến khả năng ra rễ lan Thạch học.....	35
3.4. ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ LOẠI GIÁ THỂ ĐẾN SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN LAN THẠCH HỌC SAU KHI RA CÂY .....	36
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....	38
TÀI LIỆU THAM KHẢO .....	39
PHỤ LỤC .....	42

## DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3.1. Kết quả khử trùng đoạn thân lan Thạch hộc.....	23
Bảng 3.2. Kết quả khử trùng hạt lan Thạch hộc .....	24
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng phát sinh Protocorm.....	26
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của hàm lượng saccharose đến khả năng nhân nhanh protocorm .....	27
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến khả năng phát sinh chồi từ cụm protocorm .....	28
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng phát sinh chồi từ cụm protocorm .....	30
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của BAP đến sự phát triển cụm chồi lan Thạch hộc .....	31
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của hàm lượng chuối xanh và khoai tây nghiền đến sự phát triển lan Thạch hộc .....	33
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của $\alpha$ - NAA đến khả năng tạo rễ của lan Thạch hộc.....	35
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của một số loại giá thể đến sự phát triển lan Thạch hộc	37

## DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Cây và hoa lan Thạch hộc .....	11
Hình 3.1. Hình ảnh mẫu thân lan thạch hộc sinh trưởng trên môi trường bổ sung BAP 1mg/l.....	23
Hình 3.2. Hình ảnh protocorm phát sinh từ hạt Thạch hộc trong môi trường nuôi cấy sau 40 và 60 ngày .....	25
Hình 3.2. Hình ảnh protocorm sinh trưởng trên môi trường có nồng độ BAP khác nhau.....	26
Hình 3.3. Hình ảnh protocorm sinh trưởng trên môi trường có bổ sung saccharose sau 8 tuần nuôi cấy.....	28
Hình 3.4. Chồi phát sinh từ cụm protocorm trong môi trường chứa 100ml/l nước dừa.....	29
Hình 3.5. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng phát sinh chồi từ cụm protocorm .....	30
Hình 3.6. Ảnh hưởng của BAP tới sự nhân nhanh chồi lan Thạch hộc.....	32
Hình 3.7. Ảnh hưởng của chuối xanh và khoai tây lên sự phát triển lan Thạch hộc ....	34
Hình 3.8. Ảnh hưởng của $\alpha$ - NAA đến khả năng tạo rễ của lan Thạch hộc .....	35
Hình 3.9. Hình ảnh cây lan thạch hộc con sinh trưởng trên các loại giá thể khác nhau sau khi ra chai và huấn luyện tại vườn ươm .....	37

## DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT VÀ KÝ HIỆU

Chữ viết tắt (ký hiệu)	Tên đầy đủ
ABA	Absciscic acid
ADN	Acid deoxyribonucleic
APG III	Angiosperm Phylogeny Group III
B1	Thiamine
B2	Riboflavin
BAP	6 - Benzyl adenin purine
EAC	Ehrlich ascites cells
GA3	Gibberellic acid
IAA	Indol - 3 - acetic acid
IBA	Indol - 3 - butyric acid
Kinetin	6 - furfuryl - aminopurin
MS	Murashige and Skoog
PM	Phytamax
RE	Robert Ernst
VW	Vacin <i>Went</i>
USA	United States of America
2,4 - D	2,4 - Dichlorophenoxy acetic acid
$\alpha$ - NAA	$\alpha$ - Naphthalene acetic acid



## MỞ ĐẦU

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bảo tồn và phát triển các loài cây dược liệu dân gian đang trở thành vấn đề cấp thiết, do tình trạng khai thác bừa bãi, thiếu khoa học cũng như sự giảm nhanh diện tích rừng tự nhiên, điều đó đã và đang làm giảm trầm trọng nguồn cây thuốc trong tự nhiên trong đó bao gồm cả các loài lan làm thuốc, đại diện điển hình là dược liệu lan Thạch học thuộc chi lan Hoàng thảo.

Trên thế giới, chi lan Hoàng thảo (*Dendrobium*) có khoảng 1400 loài, chủ yếu phân bố ở Đông Nam Á và các đảo thuộc Philippine, Malaysia, Indonesia, Papua New Guinea, Đông Bắc Australia. Ở Việt Nam có 107 loài và 1 thứ, phân bố ở các vùng núi từ Bắc vào Nam và trên một số đảo ven biển. Tuy nhiên, do nhiều nguyên nhân khác nhau, đến nay nhiều loài đã bị tuyệt chủng hoặc bị đe dọa. Tình trạng khai thác đến cạn kiệt hầu hết các loài phong lan rừng ở nước ta đang xảy ra mạnh, điển hình như vùng Tây Nguyên và các tỉnh phía Bắc như Hà Giang, Yên Bái, Thái Nguyên... gây nguy cơ tuyệt chủng cao một số loài phong lan quý hiếm.

Hoa Phong Lan không chỉ có tác dụng làm đẹp cho không gian sống mà còn là bài thuốc có tác dụng chữa bệnh thần kỳ. Trong đó có thể kể đến lan Kim tuyến được dùng trong điều trị các bệnh như trị đau bụng, sốt cao, rắn cắn, bệnh tiểu đường, bệnh viêm thận, huyết áp cao, yếu sinh lý, phòng ngừa u bướu và chữa các bệnh tim mạch; Lan Phi Diệp, Hoàng thảo đùi gà trị các chứng suy nhược cơ thể, thần kinh suy nhược, đau họng và yếu sinh lý ở nam giới. Lan Thạch học được dùng chữa ho lao, sốt nóng, khô cổ, ho, đau họng, khát nước thuộc chứng âm hư, nóng trong, đau lưng, chân tay nhức mỏi, ra mồ hôi trộm, thiếu năng sinh dục ở nam giới, di tinh, đau dạ dày, viêm ruột...

Hiện nay, lan rừng đang bị khai thác cạn kiệt do nhu cầu chơi hoa cũng như nhu cầu thu hái làm thuốc. Các thương lái Trung Quốc đã tràn sang các tỉnh phía bắc Việt Nam và săn lùng, thu mua số lượng lớn các loại lan có tác dụng làm thuốc. Vì vậy việc bảo tồn nguồn dược liệu tự nhiên là rất cần thiết.

Thông qua phương pháp nuôi cấy mô, tế bào thực vật với hệ số nhân giống cao có thể tạo ra rất nhiều cây con *in vitro* đồng đều mang các đặc điểm ưu việt mong muốn mà không phụ thuộc vào mùa vụ, thời tiết... góp phần thực hiện công tác bảo tồn nguồn gen phong lan tốt hơn. Thêm vào đó, phương pháp nuôi cấy mô đỉnh sinh trưởng thực vật có thể tạo ra các cây con sạch virus từ cây mẹ đã bị nhiễm bệnh (phục tráng giống cây trồng). Hơn nữa, nuôi cấy mô, tế bào còn cung cấp nguyên liệu cho việc tạo ra giống mới bằng công nghệ gen, lai soma, chọn dòng tế bào... mang các đặc điểm tốt như có hoạt tính sinh học cao, có khả năng kháng bệnh virus, chịu hạn, chịu các yếu tố bất lợi từ môi trường.

Từ các lý do trên, chúng tôi đã tiến hành đề tài "***Nghiên cứu nhân giống in vitro lan Hoàng thảo Thạch hộc (Dendrobium nobile Lindl.)***"

## **2. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU**

Nghiên cứu hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* lan rừng ***Dendrobium nobile Lindl***, góp phần cho công tác bảo tồn và cung cấp giống lan Thạch hộc.

## **3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU**

1. Nghiên cứu điều kiện khử trùng mẫu đối với lan Thạch hộc.
2. Nghiên cứu sự ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường lên quá trình tái sinh chồi, sự phát triển chồi và ra rễ của lan Thạch hộc *in vitro*.
3. Nghiên cứu giá thể phù hợp để ra cây đối với lan Thạch hộc.