

Nuôi cấy protocorm lan thạch học thiết bì (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) *in vitro*

Mai Thị Phương Hoa*, Đỗ Tiên Vinh

Đại học Nguyễn Tất Thành

*mtphoa@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Thạch học thiết bì là loại hoa lan có giá trị kinh tế và dược liệu rất cao. Thành phần hóa học của loài lan này có alkaloid, dendrobin, nobilonin; G-hydroxydendrobin; polysaccharides, alkaloid, các axit amin và các nguyên tố vi lượng như Fe, Zn, Mn, Cu, nên được sử dụng nhiều trong dược phẩm và thực phẩm. Thạch học thiết bì cần được nghiên cứu chọn lọc và nhân giống. Kết quả nghiên cứu cho thấy: thạch học thiết bì được vô trùng tốt nhất ở nồng độ javel 75% trong thời gian 20 phút. Môi trường C có bổ sung NAA 0,5mg/l, đường sucrose 30g/l là môi trường thích hợp tạo protocorm. Môi trường nhân sinh khối protocorm là môi trường C có bổ sung NAA 0,5mg/l, BA 0,1mg/l, đường sucrose 30g/l và nước dừa 10%

Nhận 06.09.2018
Được duyệt 05.09.2018
Công bố 20.09.2018

Từ khóa
thạch học thiết bì,
protocorm, nuôi cấy mô,
nhân giống trong ống
th nghiệm

© 2018 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Lan thạch học thiết bì (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) thành phần gồm có alkaloid dendrobin, nobilonin; G-hydroxydendrobin; polysaccharides (23%), các axit amin (133mg/g khô, alkaloid (0,02% - 0,04%) [1], và các nguyên tố vi lượng như Fe 292mg/g, Zn 12mg/g, Mn 53µg/g, Cu 3,6µg/g. Thạch học thiết bì có khả năng chống ung thư, kéo dài tuổi thọ, chống lão hóa, tăng sức đề kháng của cơ thể, làm dẫn mạch máu và kháng đông máu, gây mê và giảm sốt, có tác dụng tăng lượng glucose trong máu; với liều cao làm yếu hoạt động của tim, làm giảm huyết áp - khó thở được sử dụng rộng rãi trong lâm sàng và trong các bài thuốc được thị trường đón nhận [2].

Lan thạch học thiết bì phân bố rất phân tán và không liên tục do các hoạt động đốn gỗ, khai thác rừng quá mức đã tàn phá môi trường sống khiến cho giống lan này còn gần ít trong tự nhiên, trở thành loài bị đe dọa tuyệt chủng trong tự nhiên cần được bảo tồn và nhân giống nguồn gen quý này [3].

Hiện nay, nguồn cung cấp cây giống lan Thạch Học từ tự nhiên là rất ít. Lượng cây giống nuôi cấy mô được sản xuất theo phương pháp truyền thống cũng chỉ đáp ứng được nhu cầu hiện tại. Do đó, để giải quyết được vấn đề nhu cầu cây giống ngày càng tăng cần có những nghiên cứu sâu hơn về công nghệ nhân giống loại lan này. Trong đó, phương pháp

nuôi cấy tạo protocorm với hệ số nhân giống rất cao, cây con đảm bảo sạch bệnh, chất lượng đồng nhất được xem là phương pháp khả thi nhất và cần thiết phải được nghiên cứu [4]. Với mục tiêu xây dựng một qui trình hoàn chỉnh về nuôi cấy tạo sinh khối tế bào có chứa hàm lượng dược chất cao. Chúng tôi giới thiệu công nghệ nuôi cấy protocorm lan thạch học thiết bì.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu: lan thạch học thiết bì thu thập tại tỉnh Cao Bằng
Thành phần khoáng cơ bản được sử dụng cho nghiên cứu là môi trường MS, vaccine and went (VW), knudson C (C). Các chất bổ sung vào môi trường nuôi cấy gồm: đường sucrose, BA (benzyladenine), NAA (α -naphthaleneacetic acid), nước dừa, và khoai tây.

Điều kiện nuôi cấy: thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện nhiệt độ $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, cường độ ánh sáng 2000 - 3000lux, thời gian chiếu sáng 10giờ/ngày, môi trường nuôi cấy được khử trùng ở áp suất 1atm trong thời gian 20 phút.

Địa điểm nghiên cứu: Phòng thí nghiệm nuôi cấy mô khoa Công nghệ Sinh học và Môi Trường - Đại học Nguyễn Tất Thành.

Phương pháp: Thí nghiệm được bố trí theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 3 bình thủy tinh chứa 50ml môi trường nuôi cấy, mỗi bình cấy 10



mẫu. Kết quả nghiên cứu được xử lý thống kê bằng phần mềm SAS 9.1 với mức ý nghĩa tương ứng $P < 0,01$

Thiết kế thí nghiệm

Thí nghiệm 1: Vô trùng mẫu lan thạch học thiết bị: lan thạch học thiết bị sau khi thu về được rửa bằng xà bông, rửa sạch bằng nước máy, chuyển mẫu vào tủ cấy vô trùng rửa lại bằng nước cất vô trùng 2 - 3 lần, lắc cồn 70% trong 1 phút rồi rửa lại bằng nước cất 3 lần. Tiếp tục ngâm trong javel với các nồng độ thí nghiệm 50 - 75 - 100% trong thời gian 10 và 20 phút, rửa lại 3 lần bằng nước cất vô trùng. Sau đó cắt bỏ những phần mẫu bị hoại, cấy vào môi trường MS có bổ sung đường sucrose 30g/l, agar 8g/l.

Thí nghiệm 2: Khảo sát thành phần khoáng cơ bản nuôi cấy tạo protocorm: lá lan thạch học thiết bị được cắt mỏng độ dày 0,5mm, nuôi cấy trên các môi trường thí nghiệm là MS; VW; C có bổ sung NAA 2mg/l, đường sucrose 30g/l và agar 8g/l.

Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của NAA và 2,4-D đến khả năng tạo protocorm: lá lan thạch học thiết bị được cắt mỏng độ dày 0,5mm, nuôi cấy trên môi trường C có bổ sung NAA (0,5 - 1 - 2 - 4 - 5 mg/l), 2,4-D (0,5 - 1 - 2 - 4 - 5 mg/l), đường sucrose 30g/l và agar 8g/l.

Thí nghiệm 4: Khảo sát ảnh hưởng của BA và NAA đến quá trình nhân sinh khối protocorm: cấy 1g protocorm lan thạch học thiết bị vào môi trường C có bổ sung BA (0,1 - 0,5 - 1 - 2mg/l), NAA (0mg/l), đường sucrose 30g/l và agar 8 g/l.

Thí nghiệm 5: Khảo sát sự ảnh hưởng của thành phần hữu cơ đến quá trình nhân sinh khối protocorm: cấy 1 g protocorm lan thạch học thiết bị vào môi trường C có bổ sung BA (0,1mg/l), NAA (0,5mg/l), đường sucrose 30g/l, nước dừa (5 - 10 - 15 - 20%), khoai tây (25 - 50 - 75 - 100g/l) và agar 8g/l.

Các chỉ tiêu theo dõi

- Tỷ lệ mẫu vô trùng (%) = (tổng số mẫu vô trùng/tổng số mẫu ban đầu) x 100.

- Tỷ lệ mẫu sống (%) = (tổng số mẫu sống/tổng số mẫu vô trùng) x 100.

- Tỷ lệ mẫu tạo protocorm (%) = (tổng số mẫu tạo protocorm /tổng số mẫu cấy) x 100.

- Sinh khối tươi được tính bằng cách cân mẫu thu được sau 30 ngày nuôi cấy

3 Kết quả và thảo luận

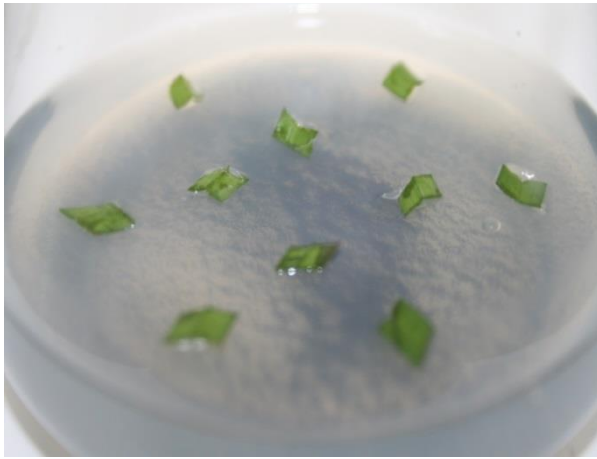
Thí nghiệm 1: Vô trùng mẫu lan thạch học thiết bị

Lan thạch học thiết bị thu thập ngoài tự nhiên thường bị bám bẩn bởi đất, các loại nấm mốc, khuẩn. Việc rửa bằng nước và xà bông chỉ có thể làm sạch đất bụi bám bên ngoài chứ không thể loại trừ hết tất cả các loại vi sinh vật. Do đó, để đảm bảo sự thành công của quá trình nuôi cấy mẫu lan thạch học thiết bị phải được vô trùng tuyệt đối trước khi tiến hành các thí nghiệm. Hiện nay, có rất nhiều chất dùng để khử trùng mẫu được sử dụng trong nuôi cấy *in vitro* như: javel, canxi hypochlorid, natri hypochlorid, $HgCl_2$... trong đó javel là chất được sử dụng phổ biến nhất vì rẻ tiền, dễ tìm và ít độc hại đối với người sử dụng. Nồng độ javel thường được sử dụng để khử trùng mẫu là từ 50 - 100% trong thời gian 10 - 30 phút. Tùy thuộc vào đặc điểm của mẫu thí nghiệm mà chúng ta chọn nồng độ và thời gian khử trùng khác nhau. Nồng độ javel quá cao sẽ làm chết mẫu, còn nồng độ thấp thì mẫu sẽ không sạch và dễ nhiễm nấm, khuẩn. Do đó, việc lựa chọn nồng độ javel thích hợp để khử trùng mẫu rất quan trọng và cần thiết.

Kết quả thể hiện ở bảng 1 cho thấy: tỉ lệ vô trùng tăng tỉ lệ thuận với nồng độ javel. Cụ thể, khi tăng nồng độ javel từ 50 - 100% thì tỉ lệ vô trùng cũng tăng từ 13,35% lên 85,45%. Thời gian khử trùng càng kéo dài thì mẫu càng sạch, tuy nhiên tỉ lệ mẫu sống sẽ giảm dần theo thời gian. Kết thúc thí nghiệm chúng tôi đã xác định được nồng độ javel 75% trong thời gian 20 phút là thích hợp nhất để khử trùng mẫu lan thạch học thiết bị.

Bảng 1 Kết quả vô trùng mẫu lan thạch học thiết bị

NT	Javel (%)	Thời gian (phút)	Tỉ lệ mẫu vô trùng (%)	Tỉ lệ mẫu sống (%)
1.1	50	10	0,00 ^e	0,00 ^d
1.2	50	20	13,35 ^d	0,00 ^d
1.3	75	10	27,67 ^c	65,33 ^{ab}
1.4	75	20	79,53^{ab}	67,85^a
1.5	100	10	82,28 ^{ab}	45,68 ^b
1.6	100	20	85,45 ^a	25,17 ^c



Hình 1 Lan thạch học thiết bì sau khi vô trùng mẫu 2 tuần

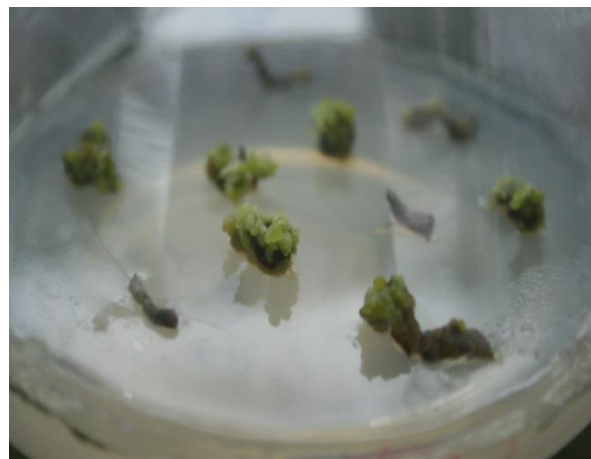
Thí nghiệm 2: Khảo sát thành phần khoáng cơ bản nuôi cấy tạo protocorm

Có nhiều loại môi trường khoáng khác nhau đã được sử dụng cho nuôi cấy mô tế bào thực vật. Chúng có hàm lượng khoáng đa lượng, vi lượng và vitamin khác nhau và do đó có ảnh hưởng khác nhau tới sự sinh trưởng và phát triển của mẫu nuôi cấy trong điều kiện *in vitro*. Môi trường khoáng được sử dụng phổ biến là MS, do hầu hết các loài cây đều

có khả năng sinh trưởng và phát triển khá tốt trên môi trường này. Môi trường C và VW là môi trường được tối ưu hóa cho nuôi cấy *in vitro* các loài hoa lan. Do vậy, thí nghiệm đánh giá tác động của các môi trường khoáng khác nhau như MS, C và VW tới khả năng sinh trưởng và phát triển protocorm cây lan thạch Học Thiết Bì *in vitro* là rất quan trọng và là cơ sở để tối ưu hóa các thành phần khác bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

Bảng 2 Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thành phần khoáng đến khả năng tạo protocorm

Nghiệm thức	Môi trường	Tỷ lệ tạo protocorm (%)
2.1	MS	27,73 ^b
2.2	C	50,44 ^a
2.3	VW	12,26 ^c



Hình 2 Lan thạch học thiết bì nuôi cấy trên môi trường C

Kết quả thí nghiệm ở bảng 2 cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê, sau 4 tuần nuôi cấy, tất cả các nghiệm thức đều phát sinh protocorm nhưng nổi trội nhất là trên môi trường C với tỉ lệ tạo protocorm đến 50,44%, protocorm phát sinh thành cụm từ mẫu cấy ban đầu, phần gốc cụm trắng và xanh dần đến ngọn, phát triển mạnh mẽ. Ở hai môi trường

còn lại là MS và VW, có phát sinh protocorm nhưng ở mật độ thấp, cụm nhỏ, thưa thớt và mẫu cấy ban đầu hóa nâu với tỉ lệ tạo protocorm lần lượt (27,73%; 12,26%). Từ kết quả trên đã xác định được môi trường C là môi trường thích hợp tạo protocorm của cây lan Thạch Học Thiết Bì *in vitro* và được sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo.

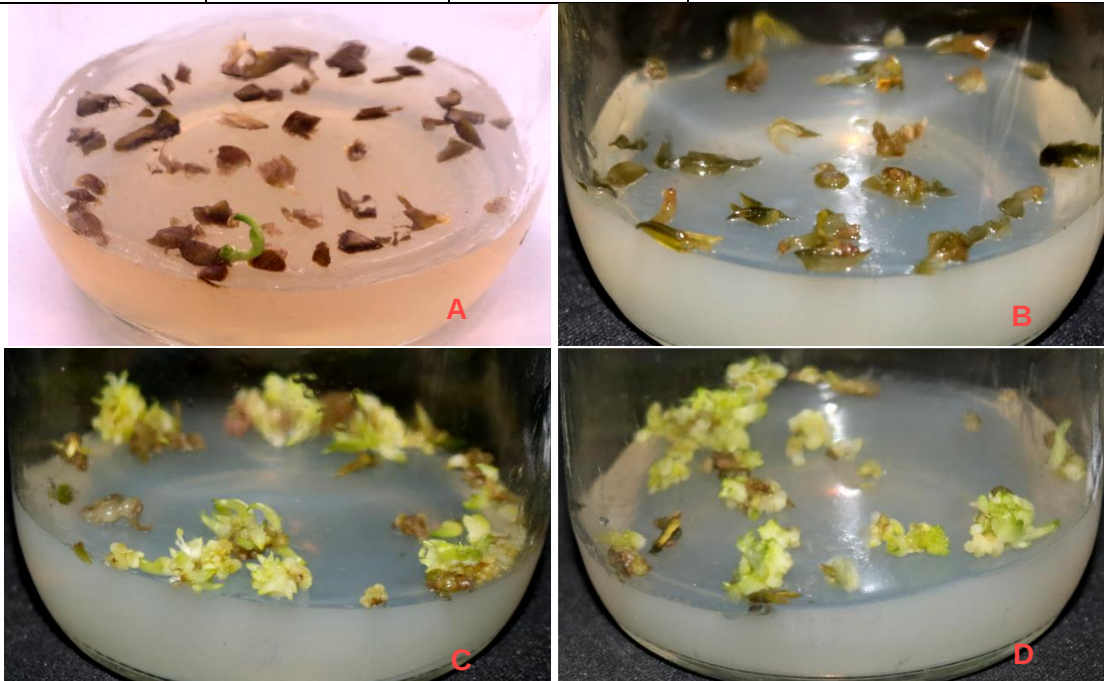
Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của NAA và 2,4-D đến khả năng tạo protocorm

Để nâng cao tỉ lệ tạo protocorm cần phải tiến hành khảo sát sự ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Auxin là nhóm chất được sử dụng khá hiệu quả trong nuôi cấy lát mỏng. Vì vậy, trong thí nghiệm này chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D, NAA ở các nồng độ (0,5 - 5mg/l) đến quá trình tạo protocorm trên cây lan thạch hộc thiết bì *in vitro*. Sau 4 tuần nuôi cấy, kết quả thể hiện ở Bảng 3 cho thấy có sự đối lập giữa hai môi trường có bổ sung 2,4-D và NAA. Ở các nghiệm thức có bổ sung 2,4-D với nồng độ biến thiên 0,5 - 5mg/l, tỉ lệ tạo protocorm giảm từ 2,65% đến 0,00%, sự phát sinh protocorm rất thấp hoặc

hoàn toàn không tạo protocorm, mẫu ban đầu hóa nâu và có hiện tượng trương nước. Khác hoàn toàn với các nghiệm thức bổ sung NAA, với tỉ lệ tạo protocorm rất cao 82,89% ở nồng độ NAA (0,5mg/l), phát sinh thành khối cụm nhỏ, màu trắng xanh. Ở nồng độ NAA biến thiên từ 1 - 5mg/l tỉ lệ tạo protocorm giảm dần từ 69,59% xuống 36,93%, do nồng độ NAA càng cao làm ức chế khả năng phát sinh protocorm, kìm hãm sự phát triển của khối protocorm. Nồng độ NAA tăng dần, hiện tượng hóa nâu phần gốc mẫu nuôi cấy càng nhiều và mẫu phát triển chậm dần. Do đó, có thể kết luận rằng nồng độ NAA 0,5mg/l thích hợp cho quá trình nuôi cấy tạo protocorm của cây lan Thạch Hộc Thiết Bì *in vitro*.

Bảng 3 Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ auxin lên quá trình tạo protocorm

Nghiệm thức	2,4-D (mg/l)	NAA (mg/l)	Tỷ lệ tạo protocorm (%)
3.1	0,5	-	2,65 ^e
3.2	1	-	1,42 ^e
3.3	2	-	1,42 ^e
3.4	3	-	0,83 ^e
3.5	4	-	-
3.6	5	-	-
3.7	-	0,5	82,89 ^a
3.8	-	1	69,59 ^b
3.9	-	2	52,86 ^c
3.10	-	3	50,02 ^c
3.11	-	4	46,84 ^{cd}
3.12	-	5	36,93 ^d



Hình 3 Protocorm lan Thạch Hộc Thiết Bì trên môi trường có bổ sung auxin
A & B: Trên môi trường bổ sung 2,4-D C & D: Trên môi trường bổ sung NAA

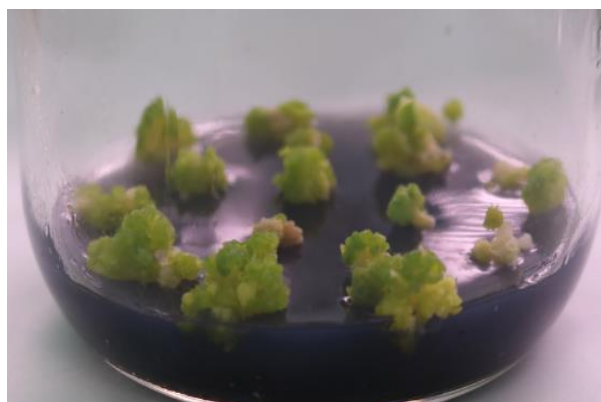
Thí nghiệm 4: Khảo sát ảnh hưởng của BA và NAA đến quá trình nhân sinh khối protocorm

Protocorm lan Thạch Hộc Thiết Bì thu được trong thí nghiệm trên tiếp tục được sử dụng làm nguồn nguyên liệu cho thí nghiệm nhân nhanh protocorm. Protocorm sau khi hình thành có thể được nhân sinh khối tiếp tục trên môi trường tương tự môi trường tạo ra nó. Tuy nhiên, ở các giai đoạn sinh trưởng khác nhau mô tế bào thực vật đòi hỏi những thành phần dinh dưỡng khác nhau. Việc thay đổi thành phần môi trường nuôi cấy này còn tùy thuộc vào mục đích của quá trình nuôi cấy. Mục tiêu của thí nghiệm này là nhân nhanh sinh khối protocorm và hạn chế sự hình thành chồi từ mẫu nuôi cấy. Trong nuôi cấy *in vitro* để điều khiển quá trình sinh trưởng phát triển của mẫu nuôi cấy các nhóm chất auxin và cytokinin được sử dụng khá phổ biến. Trong đó, Sự kết hợp sử dụng giữa BA và NAA đã cho thấy kết quả rất tốt trong nuôi cấy tế bào các loại hoa lan như Hồ Điệp, Giả Hạc, Ngọc Điểm. Để đạt được mục tiêu thí nghiệm, chúng tôi nhận thấy cần phải tiến hành khảo sát lại thành phần chất điều tiết sinh trưởng thực vật, nhằm tìm ra môi trường tối ưu để duy trì và tăng sinh khối protocorm phục vụ cho các thí nghiệm sau.

Kết quả thể hiện ở Bảng 4 cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê giữa các nghiệm thức. Nồng độ BA 0,1 và 0,5mg/l cho kết quả tăng sinh khối protocorm tốt hơn các nồng độ còn lại, cao nhất ở nồng độ 0,5mg/l đạt 19,03g. Khi tăng nồng độ BA lên 1 - 2 - 4mg/l lượng sinh khối thu được giảm đáng kể tương ứng 14,33 - 9,65 - 7,57g. Điều này có thể được lý giải là khi nồng độ BA tăng cao sẽ làm thay đổi tỉ lệ auxin/cytokinin, làm thay đổi tỉ lệ tối ưu cho mẫu phát triển. Taiz và Zeiger (2002) cho rằng nồng độ auxin tối ưu sẽ hoạt hóa một số enzyme, dẫn đến tăng hàm lượng DNA, RNA và protein giúp cho sự phân chia của tế bào. Nồng độ auxin ngoại sinh thấp hơn nồng độ tối ưu sẽ làm giảm IAA nội sinh cần thiết cho sự hoạt hóa các enzyme liên quan đến sự phiên mã RNA. Như vậy, nồng độ BA 0,1 và 0,5mg/l là thích hợp để tăng sinh protocorm lan Thạch Hộc Thiết Bì. Tuy nhiên, lượng sinh khối thu được ở hai nồng độ trên không có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê. Do đó, để giảm chi phí sản xuất và hạn chế sử dụng chất điều tiết sinh trưởng thực vật chúng tôi chọn nồng độ BA 0,1mg/l để kết hợp với NAA 0,5mg/l làm tác nhân điều khiển quá trình tăng sinh khối trong các thí nghiệm sau.

Bảng 4 Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của BA và NAA lên quá trình nhân sinh khối protocorm lan Thạch Hộc Thiết Bì *in vitro*

NT	BA (mg/l)	NAA (mg/l)	Sinh khối tươi (g)
4.1	0,1	0,5	18,45 ^{ab}
4.2	0,5	0,5	19,03 ^a
4.3	1	0,5	14,33 ^b
4.4	2	0,5	9,65 ^c
4.5	4	0,5	7,57 ^d



Hình 4 Protocorm lan Thạch hộc thiết bì *in vitro* trên môi trường thí nghiệm bổ sung BA 0,1 mg; A sau khi cấy 10 ngày; B sau khi cấy 30 ngày

Thí nghiệm 5: Khảo sát sự ảnh hưởng của thành phần hữu cơ đến quá trình nhân sinh khối protocorm

Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật ngoài chất điều hòa sinh trưởng, thành phần vô cơ, nguồn nitrogen, nguồn carbon, hàm lượng agar, pH môi trường, sự phát triển của tế bào

thực vật còn chịu sự tác động của các chất hữu cơ bổ sung và dịch chiết [6]. Vì vậy, để nâng cao hiệu quả tăng sinh khối lan protocorm lan Thạch hộc thiết bì, chúng tôi tiến hành nghiên cứu sự ảnh hưởng của các nguồn hữu cơ bổ sung. Các thành phần hữu cơ thường được sử dụng trong

nuôi cấy là nước dừa, dịch chiết lúa mạch, chuối, khoai tây, nước cam, nước cà chua, casein, lactalbumin. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng nước dừa và khoai tây có tác dụng rất tốt cho quá trình nuôi cấy lan Thạch Hộc Thiết Bì. Trong nước dừa có chứa zeatin và một số cytokinin khác có tác dụng thúc đẩy hoạt động phân chia tế bào; nước dừa cũng có chứa một số acid amine hạn chế khác [7]. Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) cũng cho biết trong nước dừa có nhiều protein, carbohydrate, calcium, các hợp chất sắt,

đường, và một số vitamin như thiamin, riboflavin, niacin, acid ascorbic. Các chất này có thể đóng vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy hoạt động tăng trưởng và phân chia tế bào. Khoai tây là một loại củ rất giàu các acid amin như lysine, methionine, threonine, tryptophan, vitamin c, vitamin B6, khoáng đặc biệt rất giàu sắt rất thích hợp cho sự sinh trưởng của mô nuôi cấy. Do đó, trong thí nghiệm này chúng tôi tiếp tục sử dụng hai nguồn hữu cơ trên.

Bảng 5 Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của các thành phần hữu cơ đến quá trình nhân sinh khối protocorm lan Thạch hộc thiết bì *in vitro*

Nghiệm thức	Nước dừa (%)	Khoai tây (g/l)	Sinh khối tươi (g)
ĐC	-	-	16,45 ^d
5.1	5	-	18,42 ^{cd}
5.2	10	-	25,83^{ab}
5.3	15	-	26,53 ^{ab}
5.4	20	-	27,03 ^a
5.5	-	25	16,10 ^d
5.6	-	50	18,47 ^{cd}
5.7	-	75	22,63 ^b
5.8	-	100	19,23 ^c

Kết quả thí nghiệm cho thấy việc bổ sung nước dừa và khoai tây đều cho kết quả tăng sinh tốt hơn so với mẫu đối chứng. Các nghiệm thức từ 5.5 - 5.8 với thành phần bổ sung là khoai tây, lượng sinh khối thu được đạt cao nhất ở nghiệm thức 5.7 với nồng độ khoai tây 75g/l (sinh khối tươi đạt 22,63g). Kết quả này vẫn thấp hơn rõ rệt so với các nghiệm thức sử dụng nước dừa. Cụ thể, hệ số tăng sinh tăng

tỉ lệ thuận với nồng độ nước dừa từ 5 - 20% và đạt kết quả tốt nhất là 27,03g. Tuy nhiên, kết quả phân tích thống kê cho thấy sự khác biệt giữa các nghiệm thức sử dụng nước dừa 10 - 15 - 20% là không đáng kể. Vì vậy, chúng tôi chọn nồng độ nước dừa 10% là thích hợp nhất để bổ sung vào môi trường nuôi cấy



Hình 5 Protocorm Lan Thạch Hộc Thiết Bì trên môi trường bổ sung nước dừa 10%

4 Kết luận

Nồng độ javel 75% trong thời gian 20 phút là thích hợp nhất để khử trùng mẫu lan thạch hộc thiết bì. Môi trường C có bổ sung NAA 0,5mg/l, đường sucrose 30g/l là môi

trường thích hợp tạo protocorm. Nhân sinh khối protocorm tốt nhất trên môi trường C có bổ sung NAA 0,5mg/l, BA 0,1mg/l, đường sucrose 30g/l và nước dừa 10%.

Tài liệu tham khảo

1. Zhu Y, Ding H, Wang Z, Yang Y, Xiang X., **2010**. Effect of epigallocatechin-3-gallate on the activity of alpha-glucosidase in vitro. *Wei Sheng Yan Jiu* 39(2):168-71, 176
2. Liu B, Larsson L, Franssens V, Hao X, Hill SM, Andersson V, Höglund D, Song J, Yang X, Öling D, Grantham J, Winderickx J, Nyström T, 2011. Segregation of protein aggregates involves actin and the polarity machinery. *Cell* 147(5):959-61
3. Gu S., Ding X. Y., Wang Y., Zhou Q., Ding G., Li X. X. and Qian, 2007. Isolation and characterization of microsatellite markers in *Dendrobium officinale*, an endangered herb endemic to China. *Molecular Ecology Notes* 7: 1166-1168.
4. Trần Văn Minh, 2013. *Công nghệ sinh học thực vật*. Giáo trình cao học - nghiên cứu sinh, Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, 751 trang.
5. Taiz, L. and Zeiger, E. (2002). Effect of Photon Flux Density and Exogenous Sucrose on the Photosynthetic Performance during *In Vitro* Culture of *Castanea sativ*. *American Journal of Plant Sciences* 7: 2087-2105
6. Trần Văn Minh, 2006. *Công nghệ sinh học thực vật*, Đại học Văn Lang, Hồ Chí Minh, Việt Nam, 486 trang.
7. Letham, 1974. Regulators of Cell Division in Plant Tissues The Cytokinins of Coconut Milk, *physiologia plantarum*, 32 (1): 66-70

Dendrobium officinale Kimura et Migo Protocorm Culture

Phuong Hoa Mai Thi*, Tien Vinh Do

Nguyen Tat Thanh University

*mtphoa@ntt.edu.vn

Abstract *Dendrobium officinale* Kimura et Migo is an orchid with high economic value and medicinal properties. The chemical composition of this orchid is alkaloid, dendrobin, nobilonin; G-hydroxydendrobin; polysaccharides, alkaloids, amino acids and Fe, Zn, Mn, Cu should be used in medicine and food industries. *Dendrobium officinale* Kimura et Migo need to be carefully selected and propagated. Research results show that: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo Sterilizers are best sterilized at 75% Javel for 20 minutes. Medium C supplemented with 0.5mg/l NAA, sucrose 30g/l was the suitable protocorm medium. The protocorm culture medium is C medium containing NAA0.5mg/l, 0.1 mg/l BA, 30g/l sucrose and 10% coconut water.

Keywords *Dendrobium officinale* Kimura et Migo, protocorm, in vitro propagation, micropropagation