

EFFECT OF BASAL MEDIUM AND PLANT GROWTH REGULATORS ON SEED GERMINATION, DIFFERENTIATION AND SHOOT REGENERATION OF *PAPHIOPEDILUM CONCOLOR* (LINDL.) PFITZ

Vu Thi Lan^{1*}, Nguyen Quoc Khanh², Do Tien Phat³

¹TNU - University of Science, ²Linh Son Secondary School

³Institute of Biotechnology - VAST

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 07/4/2022	<i>Paphiopedilum concolor</i> (Lindl.) Pfitz is a native species of Northern Vietnam. Recently, this species has been extremely exploited in nature due to deforestation and over-collection, so it is essential to develop in vitro propagation methods for conservation. This paper represent that we have successfully studied a number of factors affecting the efficiency of propagation of <i>Paphiopedilum concolor</i> by in vitro seed germination, including suitable mineral medium for seed germination, suitable media added plant growth regulators for differentiation and shoot formation, a suitable medium for shoot regeneration and seedling growth. Seeds were cultured on ½ MS or ½ VW medium gave high germination rates (82.5% and 80%, respectively), germination time was 37.5 to 40 days. The suitable medium for the differentiation and development of germinated seeds was P5 medium (VW + BAP 1.0 mg/L, NAA 0.5 mg/L, banana homogenate 30 g/L, potato homogenate 40 g/L) with the highest percentage of shoot formation (50.1%). The suitable medium for shoot regeneration and seedling growth was VW medium supplemented with BAP 2.0 mg/L, NAA 0.5 mg/L, number of shoots/sample reached 2.0, number of leaves/shoot reached 3.5, leaf length reaches 1.35 cm, seedlings with large, dark green and thick leaves. These results are basis for further studies on in vitro propagation of <i>P. concolor</i> in Vietnam.
Revised: 24/6/2022	
Published: 24/6/2022	
KEYWORDS	
Germination	
Medium	
<i>Paphiopedilum concolor</i>	
Plant growth regulator	
Seed	

ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG CƠ BẢN VÀ CHẤT ĐIỀU HÒA SINH TRƯỞNG ĐẾN SỰ NẤY MẦM HẠT, BIỆT HÓA VÀ TÁI SINH CHỒI LAN HÀI ĐÓM (*Paphiopedilum concolor* Lindl. Pfitz)

Vũ Thị Lan^{1*}, Nguyễn Quốc Khánh², Đỗ Tiến Phát³

¹Trường Đại học Khoa học - ĐH Thái Nguyên, ²Trường Trung học cơ sở Linh Sơn

³Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 07/4/2022	Lan hài Đốm (<i>Paphiopedilum concolor</i> Lindl. Pfitz) là loài Lan hài bản địa của miền Bắc Việt Nam. Hiện nay, loài này đã bị khai thác cạn kiệt ngoài tự nhiên nên việc phát triển phương pháp nhân giống in vitro để bảo tồn là rất cần thiết. Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu về một số yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả nhân giống in vitro Lan hài Đốm bao gồm môi trường khoáng phù hợp cho hạt nảy mầm, môi trường cho phát triển cây con từ hạt, môi trường phù hợp cho tái sinh chồi và sinh trưởng cây con in vitro. Kết quả cho thấy hạt Lan hài Đốm ở độ tuổi 190 ngày (sau thụ phấn) nuôi cấy trên môi trường ½MS hoặc ½VW cho tỷ lệ hạt nảy mầm cao là 82,5% và 80%, thời gian nảy mầm là 37,5 đến 40 ngày. Môi trường phù hợp cho biệt hóa và phát triển của hạt nảy mầm là môi trường P5 (VW + BAP 1,0 mg/L, NAA 0,5 mg/L, chuối 30 g/L, khoai tây 40 g/L) có tỷ lệ tạo chồi đạt cao nhất (50,1%). Môi trường phù hợp cho tái sinh chồi và sinh trưởng của cây con là môi trường VW bổ sung BAP 2,0 mg/L, NAA 0,5 mg/L, số chồi/mẫu đạt 2,0, số lá/chồi đạt 3,5, chiều dài lá đạt 1,35 cm, chồi to, lá xanh đậm và dày.
Ngày hoàn thiện: 24/6/2022	
Ngày đăng: 24/6/2022	
TỪ KHÓA	
Chất điều hòa sinh trưởng	
Hạt	
Lan hài Đốm	
Môi trường	
Nảy mầm	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.5821>

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

1. Giới thiệu

Nhiều loài Lan hài thuộc chi *Paphiopedilum* rất quý hiếm, được công nhận và bảo vệ bởi tổ chức CITES. Hiện nay, các loài lan này ở Việt Nam đang bị đe dọa có nguy cơ tuyệt chủng do nạn chặt phá rừng và sự khai thác quá mức, nên cần thiết phải được ưu tiên bảo vệ [1]. Chi *Paphiopedilum* có đặc điểm là cây có tốc độ sinh trưởng phát triển rất chậm, tỷ lệ hạt nảy mầm rất thấp. Hiện nay, hướng nghiên cứu nhân giống các loài Lan hài ở Việt Nam đang rất được quan tâm nhằm mục đích bảo tồn nguồn gen và tiến tới thương mại hóa. Đã có nhiều nghiên cứu về chi *Paphiopedilum*, chủ yếu là phương thức nhân giống thông qua nảy mầm hạt không cộng sinh [2]-[4], tái sinh chồi trực tiếp từ lá [5], việc nhân giống Lan hài phụ thuộc rất lớn vào loài, đa số các báo cáo cho rằng nuôi cấy loài Lan hài lai thường dễ dàng hơn các loài bản địa. Quá trình nảy mầm và phát triển của hạt có thể bị ảnh hưởng rất lớn bởi các yếu tố như tuổi của hạt, việc xử lý hạt trước khi nuôi cấy, môi trường cũng như điều kiện, phương pháp nuôi cấy [4]. Đã có một số công trình nghiên cứu trên các loài Lan hài ở Việt Nam như đánh giá sự đa dạng di truyền của các loài Lan hài [6], [7], nghiên cứu phương pháp nhân giống ở một số loài như hài Hằng [8], hài Đỏ [9], hài Hồng [10], [11], hài Vân, hài Tam đảo [12]. Tuy nhiên, sự thành công của việc nhân giống tùy thuộc vào từng loài và mới chỉ thành công trên một số loài Lan hài nhất định. Lan hài Đóm *Paphiopedilum concolor* Lindl. Pfitz là loài Lan hài bản địa của Việt Nam. Loài này có hoa to, màu vàng nhạt với nhiều chấm nhỏ màu tím, phân bố khá rộng ở các dãy núi đá vôi có độ cao trung bình của các tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam như Bắc Kạn, Thái Nguyên, Vĩnh Phúc,...[1]. Hiện nay, loài này cũng đã bị khai thác gần như cạn kiệt ngoài tự nhiên. Vì vậy, việc nghiên cứu nhân giống *in vitro* Lan hài Đóm có ý nghĩa rất quan trọng trong công tác duy trì, bảo tồn và phát triển nguồn gen. Đã có các nghiên cứu về *P. concolor* của Việt Nam như nghiên cứu sự đa dạng di truyền [13], nhân giống từ mầm ngủ thân mầm [14], hoặc tái sinh cây từ chồi ngọn *ex vitro* và gieo hạt [15]. Tuy nhiên, hiệu quả tái sinh chồi loài Lan này trong các báo cáo còn rất thấp, cần có các nghiên cứu sau hơn để cải thiện tỷ lệ nảy mầm hạt và hệ số nhân chồi. Bài báo này chúng tôi báo cáo các kết quả nghiên cứu mới về ảnh hưởng của môi trường cơ bản và các chất điều hòa sinh trưởng đến sự nảy mầm, biệt hóa và phát triển của hạt sau nảy mầm, sự nhân chồi từ cây mầm và sinh trưởng của cây con Lan hài Đóm *in vitro*.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu và điều kiện nuôi cấy

Vật liệu thực vật

Quả có độ tuổi khoảng 190 ngày sau khi thụ phấn bằng tay được thu hái từ các cây lan *Paphiopedilum concolor* khỏe mạnh, sạch bệnh tại vườn ươm Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) [16], VW (Vacin, Went, 1949) [17] và các chất điều hòa sinh trưởng (ĐHST) thực vật.

Điều kiện nuôi cấy

Hạt được nảy mầm trong tối ở 2-3 tuần đầu. Các nghiên cứu biệt hóa và phát triển của hạt nảy mầm, tái sinh chồi và sinh trưởng cây con *in vitro* được thực hiện trong điều kiện chiếu sáng 2.500 - 3.000 lux, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, ẩm độ 80% và chu kỳ quang là 16/8 (sáng/tối).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Khử trùng quả Lan hài

Quả lan không bị tổn thương và sạch bệnh được rửa sạch dưới vòi nước chảy, ngâm trong xà phòng loãng khoảng 5 phút, rửa sạch bằng nước cất. Quả tiếp tục được khử trùng bằng NaOCl ở nồng độ 2,5% trong 30 phút. Sau đó, quả được rửa lại nhiều lần bằng nước cất khử trùng.

Nảy mầm Lan hài Đóm

Hạt được tách từ quả lan sau khi khử trùng, được gieo trên các môi trường khoáng cơ bản gồm môi trường MS, ½ MS, môi trường VW, ½VW và môi trường MS có bổ sung BAP 2 mg/L. Tất cả các môi trường nuôi cấy đều được bổ sung sucrose 30 g/L, than hoạt tính 0,5 g/L, agar 7 g/L, pH môi trường 5,8.

Sự biệt hóa và phát triển của hạt nảy mầm

Hạt nảy mầm trên môi trường gieo hạt (có màu trắng, trong) được cấy chuyển sang môi trường khác nhau để kích thích sự biệt hóa và phát triển của hạt nảy mầm. Thành phần và ký hiệu môi trường phát triển cây mầm được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Thành phần môi trường nghiên cứu sự biệt hóa và phát triển của hạt nảy mầm

Kí hiệu môi trường	Thành phần môi trường
ĐC1	MS + sucrose 20 g/L, than hoạt tính 0,5 g/L, agar 7 g/L, nước dừa 100 ml/L
ĐC2	VW + sucrose 20 g/L, than hoạt tính 0,5 g/L, agar 7 g/L, nước dừa 100 ml/L
P3	ĐC1+ BAP 1,0 mg/L, NAA 0,5 mg/L, chuối 30 g/L, khoai tây 40 g/L
MT1 - MT6	ĐC1 + BAP bổ sung các nồng độ (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0) mg/L
MT7 – MT8	ĐC2 + BAP bổ sung nồng độ 1,0 và 2,0 mg/L
P5	ĐC2 + BAP 1,0 mg/L, NAA 0,5 mg/L, chuối 30 g/L, khoai tây 40 g/L
NC6	ĐC2 + BAP 2,0 mg/L, NAA 0,5 mg/L

Tái sinh chồi từ cây non in vitro

Các chồi *in vitro* non sau khi nảy mầm từ hạt được khoảng 7 - 8 tuần, có từ 1 - 2 lá được cấy chuyển lên các môi trường nuôi cấy là ĐC2 bổ sung chất ĐHST là BAP riêng rẽ hoặc bổ sung kết hợp BAP với NAA để nghiên cứu khả năng tái sinh và sinh trưởng của cây con *in vitro*. Môi trường đối chứng là ĐC2 (Bảng 1), các môi trường thí nghiệm là môi trường NC1-NC4 bổ sung BAP riêng rẽ từ 1,0 – 4,0 mg/L, môi trường NC5-NC8 (bổ sung kết hợp BAP nồng độ 1,0 – 2,0 mg/L với NAA từ, 0,25 - 0,5 mg/L).

Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 3 - 5 bình. Đối với thí nghiệm gieo hạt, mỗi lần lặp lại xử lý 3 bình, mỗi bình cấy lượng hạt tương đương nhau. Đối với thí nghiệm nghiên cứu khả năng biệt hóa và phát triển của hạt nảy mầm, mỗi thí nghiệm cấy 3 bình, mỗi bình 15 - 20 mẫu. Thí nghiệm nghiên cứu khả năng tái sinh và sinh trưởng chồi, cấy 5 bình, mỗi bình 4 - 6 mẫu. Các số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học và trình ứng dụng Statgraphics centurion XVI. Các giá trị trung bình theo sau bởi các chữ cái khác nhau (a, b, c,...) trong cùng một cột ở các bảng số liệu thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo phép kiểm định Duncan với $p < 0,05$.

3. Kết quả và thảo luận

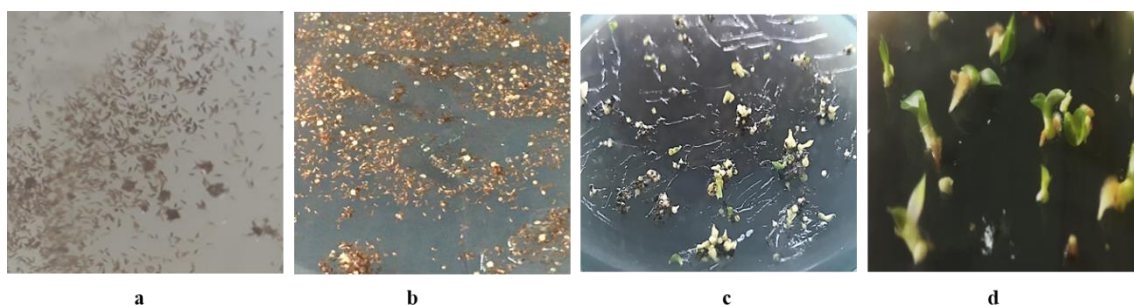
3.1. Khả năng nảy mầm của hạt Lan hài Đốm trên các môi trường khoáng khác nhau

Hạt có độ tuổi từ 190 ngày sau thụ phấn được gieo trên 5 môi trường có hàm lượng khoáng khác nhau gồm MS, ½MS, VW, ½VW, MS + BAP 2 mg/L đã có sự khác biệt nhau rõ rệt về khả năng nảy mầm của hạt (Bảng 2, Hình 1).

Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến khả năng nảy mầm của hạt Lan hài Đốm sau 60 ngày

Môi trường	Thời gian nảy mầm* (ngày)	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Đặc điểm hạt nảy mầm
MS	45,0 ± 7,1 ^{ab}	50,0 ± 28,3 ^{ab}	Trắng, nhỏ
1/2MS	37,5 ± 3,5 ^a	82,5 ± 3,5 ^a	Trắng, nhỏ
VW	42,5 ± 3,5 ^{ab}	55,0 ± 35,4 ^{ab}	Trắng, nhỏ
1/2VW	40,0 ± 1,4 ^a	80,0 ± 7,1 ^a	Trắng, nhỏ
MS + 2 BAP	55,0 ± 7,1 ^b	25,0 ± 7,1 ^b	Trắng, nhỏ

*: hạt nảy mầm ở giai đoạn đầu phôi tròn, trắng trong



Hình 1. Hạt nảy mầm trên các môi trường $\frac{1}{2}$ MS và $\frac{1}{2}$ VW: (a) Hạt sau khử trùng và gieo trên môi trường, (b) Hạt bắt đầu nảy mầm sau 40 ngày, (c) Mầm chồi trắng hình thành từ protocorm, (d) Chồi có lá xanh và cây hoàn chỉnh

Thời gian nảy mầm của hạt trên cả năm môi trường nuôi cấy đều tương đối ngắn, chỉ từ 37,5 đến 55 ngày. Trong đó, hạt trên môi trường khoáng MS và VW đầy đủ có thời gian nảy mầm lâu hơn trên môi trường có thành phần giảm một nửa, trung bình là 42,5 đến 45 ngày. Trong khi đó, môi trường $\frac{1}{2}$ MS và $\frac{1}{2}$ VW có thời gian nảy mầm của hạt sớm hơn, lần lượt là 37,5 và 40 ngày, môi trường MS bổ sung BAP 2 mg/L có thời gian nảy mầm lâu nhất là 55 ngày. Như vậy, việc bổ sung BAP vào môi trường gieo hạt không làm tăng khả năng nảy mầm của hạt lan hài Đốm. Mặc dù vậy, tốc độ nảy mầm của hạt lan hài trong nghiên cứu này nhanh hơn so với nghiên cứu trước đây trên cùng môi trường MS bổ sung 2 mg/L BAP [15]. Trong nghiên cứu đó, hạt được tách từ quả lan khử trùng bằng HgCl_2 có thời gian nảy mầm từ 90 đến 100 ngày. Do vậy có thể thấy, hóa chất khử trùng có ảnh hưởng quan trọng đến sự nảy mầm của hạt.

Tỷ lệ nảy mầm của hạt trên các môi trường nuôi cấy cũng có sự khác biệt đáng kể. Môi trường $\frac{1}{2}$ MS và $\frac{1}{2}$ VW cho tỷ lệ nảy mầm cao hơn so với các môi trường còn lại, đạt lần lượt là 82,5% và 80% (Bảng 2, Hình 1b). Trong khi môi trường MS và VW có tỷ lệ nảy mầm thấp hơn, lần lượt là 50 và 55%. Môi trường MS có BAP 2 mg/L cho tỷ lệ hạt nảy mầm thấp nhất, chỉ đạt 25%. Như vậy môi trường MS và VW khoáng có hàm lượng giảm một nửa đã có hiệu quả tốt hơn cho sự nảy mầm của hạt. Kết quả này phù hợp với báo cáo của Li và đồng tác giả khi cho rằng môi trường $\frac{1}{2}$ MS và $\frac{1}{4}$ MS thích hợp cho nảy mầm ở *P. concolor* [18]. Đối với loài *P. wardii*, sự nảy mầm trên môi trường MS cũng thấp hơn đáng kể so với môi trường $\frac{1}{2}$ MS [2].

Các nghiên cứu về Lan hài đã cho thấy tỷ lệ nảy mầm của các giống khác nhau phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố và cả đặc tính loài. Hầu hết các loài thuộc chi *Paphiopedilum* có khả năng nảy mầm tốt hơn trên môi trường khoáng thấp. Các môi trường 1/2, 1/4, 1/5, 1/6 hoặc 1/8 MS đã được khẳng định có hiệu quả tốt hơn cho nảy mầm của hạt chi lan hài *Paphiopedilum* [4]. Ngoài ra, thành phần môi trường khoáng cũng ảnh hưởng tới khả năng nảy mầm của các loài thuộc chi *Paphiopedilum*. Nhut và đồng tác giả (2005) cho rằng, hạt của *P. delenatii* 9 tháng tuổi nảy mầm tốt hơn trên môi trường Knudson C so với môi trường MS hoặc $\frac{1}{2}$ MS [19]. Tuy nhiên, khả năng nảy mầm của hạt *Cymbidium finlaysonianum* Lindl đạt cao nhất là 83,8% trên môi trường VW [20]. Do vậy có thể thấy, đối với mỗi loài Lan hài cần thiết tìm ra môi trường thích hợp cho quá trình nảy mầm của hạt.

3.2. Sự biệt hóa và phát triển của hạt nảy mầm trên các môi trường khoáng bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng

Sự nảy mầm hạt ở các loài Lan hài ngoài ảnh hưởng của hàm lượng và thành phần môi trường khoáng còn chịu ảnh hưởng lớn bởi thành phần môi trường dinh dưỡng và việc bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng (ĐHST). Trong nghiên cứu này, hạt nảy mầm tốt trên hai môi trường gieo hạt $\frac{1}{2}$ MS và $\frac{1}{2}$ VW được cấy chuyển sang môi trường mới có bổ sung các chất ĐHST với nồng độ khác nhau (Bảng 1).

Kết quả nuôi cấy sau 40 đến 50 ngày đã cho thấy các môi trường đã có sự biệt hóa tạo chồi, tuy nhiên số lượng chồi thu được khá thấp và tốc độ biệt hóa cũng có sự khác nhau giữa các môi

trường nuôi cấy (Bảng 3). Đa phần các chồi tạo thành có lá non màu vàng nhạt hoặc trắng. Đến 70 ngày, những chồi này đã có lá xanh, riêng môi trường P5 đã tạo thành chồi hoàn chỉnh có 1-2 lá xanh và rễ (Hình 1d). Như vậy, việc bổ sung BAP và NAA đã có hiệu quả tốt đối với việc hình thành chồi sau 70 ngày so với đối chứng, trong đó môi trường MS bổ sung BAP với nồng độ 2,0 mg/L đến 3,0 mg/L cho sự biệt hóa của hạt nảy mầm khá tốt, nhiều hạt phát triển thành protocorm trắng, to và xuất hiện mầm chồi, số chồi xanh hình thành nhiều hơn so với các nồng độ BAP khác, đạt cao nhất 4,0 chồi/bình. Môi trường MT7 và MT8 (Môi trường VW bổ sung BAP 1,0 và 2,0 mg/L) cũng có sự biệt hóa của hạt nảy mầm tốt, số chồi tạo thành đạt 4,0 chồi/bình ở nồng độ BAP 2 mg/L. Điều này cho thấy môi trường MS hay VW bổ sung BAP ở nồng độ 2,0 mg/L đều phù hợp cho giai đoạn biệt hóa hạt nảy mầm.

Bảng 3. Ảnh hưởng của môi trường khoáng bổ sung chất ĐHST đến sự hình thành chồi từ hạt nảy mầm ở giai đoạn 1 sau 70 ngày

Môi trường	BAP (mg/L)	NAA (mg/L)	Thời gian tạo chồi (ngày)	Số chồi/bình	Đặc điểm chồi/protocorm
ĐC1 (MS)	0	0	-	0 ^d	Protocorm trắng
MT1	0,5	0	55	1,0 ^{cd}	Chồi trắng
MT2	1,0	0	55	1,0 ^{cd}	Chồi xanh nhạt
MT3	1,5	0	55	2,0 ^{bc}	Chồi có lá xanh
MT4	2,0	0	45	4,0 ^a	Chồi có lá xanh
MT5	2,5	0	50	4,0 ^a	Chồi vàng nhạt
MT6	3,0	0	50	3,5 ^{ab}	Mầm chồi xanh
P3	1,0	0,5	50	2,0 ^{bc}	Mầm chồi vàng nhạt
ĐC2 (VW)	0	0	-	0,0 ^d	Protocorm trắng
MT7	1,0	0	40	3,5 ^{ab}	Mầm chồi vàng nhạt
MT8	2,0	0	40	4,0 ^a	Chồi có lá xanh
P5	1,0	0,5	50	4,0 ^a	Chồi hoàn chỉnh (có rễ, lá xanh)

Ghi chú: ĐC1 đến P3: môi trường nền là MS; ĐC2 đến P5: Môi trường nền là VW, “-”: không có kết quả

Đối với môi trường P3 và P5 (bổ sung kết hợp BAP 1,0 mg/L, NAA 0,5 mg/L và các chất hữu cơ thực vật là nước dừa 100 ml/L, khoai tây 40 g/L, chuối 30 g/L cho thấy có hiệu quả tốt thúc đẩy sự biệt hóa chồi. Môi trường P5 cho sự biệt hóa chồi sớm hơn môi trường P3, đến 50 ngày đã tạo chồi hoàn chỉnh có rễ và lá xanh (Hình 1d), trong khi môi trường P3 hạt nảy mầm và biệt hóa chậm hơn tạo mầm chồi vàng nhạt, chưa có lá xanh và rễ. Như vậy, môi trường nền MS và VW khi bổ sung các chất ĐHST không ảnh hưởng nhiều đến số chồi hình thành nhưng khi bổ sung tổ hợp với các chất hữu cơ có ảnh hưởng đến tốc độ biệt hóa và phát triển chồi. Các môi trường cho kết quả hình thành chồi tốt là MT4, MT8 và P5.

Các nghiên cứu về Lan hài đã cho thấy các chất ĐHST thực vật khác nhau có tác động khác nhau đến sự nảy mầm ở các loài khác nhau. Mặc dù, khi không có các chất ĐHST ngoại sinh thì hạt của *Paphiopedilum* vẫn có thể nảy mầm tuy, nhiên tỷ lệ nảy mầm được cải thiện đáng kể khi được bổ sung chất ĐHST với nồng độ phù hợp. Ngoài ra, việc bổ sung các chất hữu cơ từ thực vật cũng đã được báo cáo có tác dụng khác nhau đến sự nảy mầm của hạt. Việc bổ sung nước dừa vào môi trường khoáng khi gieo hạt đã được báo cáo. Chen và đồng tác giả (2015) đã bổ sung nước dừa vào môi trường khoáng RE và MS khi gieo hạt *P. Spicerianum* cho thấy tỷ lệ nảy mầm cao nhất đạt được ở môi trường RE có nước dừa so với môi trường MS có nước dừa với chu kỳ nuôi 24 giờ tối sau khi xử lý với 1,0% NaOCl khoảng 40 phút [20]. Theo Li và đồng tác giả (2016), bổ sung 100 ml/L nước dừa (CW) và 1 g/L peptone có tác động tích cực đến sự nảy mầm của hạt và biệt hóa của protocorm *P. concolor* [18].

Sự biệt hóa chồi của protocorm trên môi trường khoáng bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau

Từ các kết quả nghiên cứu thu được chúng tôi đã lựa chọn một số môi trường bổ sung chất ĐHST cho hiệu quả hình thành chồi tốt để tiếp tục đánh giá sự biệt hóa của protocorm (Bảng 4).

Các môi trường nghiên cứu đã có ảnh hưởng đến sự biệt hóa và phát triển của protocorm và có tỷ lệ tạo chồi cao hơn so với đối chứng ĐC1. Sau 40 ngày nuôi cấy, các môi trường bổ sung BAP riêng rẽ với nồng độ 1,0 và 2,0 mg/L (MT2, MT8) và bổ sung kết hợp BAP 2,0 mg/L với NAA 0,5 mg/L (NC6) tỷ lệ tạo chồi sau 40 ngày là tương đương nhau và không khác biệt so với môi trường đối chứng, tỷ lệ tạo chồi đạt 20,2 đến 27%. Môi trường P5 có tỷ lệ tạo chồi đạt cao nhất (48,2%), điều này chứng tỏ môi trường P5 đã thúc đẩy sự biệt hóa và tạo chồi sớm hơn so với các môi trường còn lại.

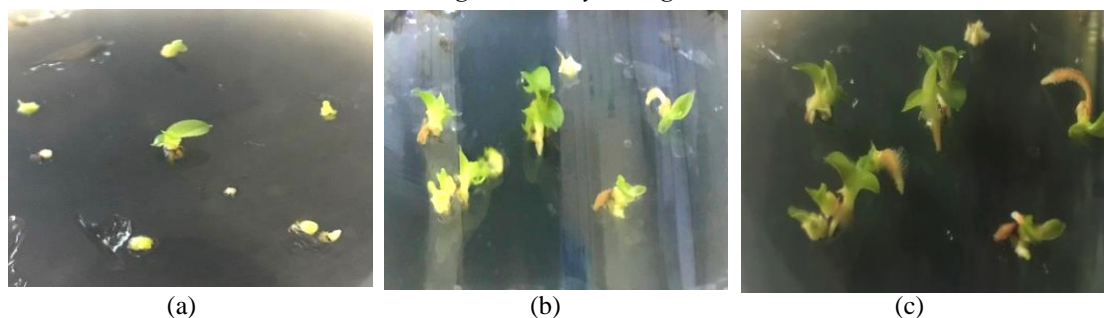
Sau 60 ngày, tỷ lệ tạo chồi ở các môi trường nghiên cứu tăng lên đáng kể so với 40 ngày và có sự khác biệt rõ rệt giữa các môi trường bổ sung BAP với các nồng độ khác nhau. Trong đó, môi trường P5 có tỷ lệ tạo chồi đạt nhất (50,1%), tiếp đến là môi trường NC6 cho tỷ lệ tạo chồi đạt khá cao (42,1%). Môi trường MT4 và MT8 (BAP bổ sung 2,0 mg/L) tỷ lệ tạo chồi đạt cao hơn so với MT2 và MT7, đạt là 36,3 - 36,9%. Điều này cho thấy môi trường khoáng MS và VW không ảnh hưởng khác biệt đến khả năng tạo chồi, mà phụ thuộc vào nồng độ chất ĐHST bổ sung vào môi trường. Khi bổ sung BAP 2 mg/L kết hợp với NAA 0,5 mg/L đã làm tăng tỷ lệ tạo chồi so với chỉ bổ sung riêng BAP 2 mg/L. Khi bổ sung kết hợp tổ hợp BAP và NAA với chuối và khoai tây, nước dừa ở môi trường P5 đã có tác dụng tốt đến khả năng biệt hóa chồi của hạt nảy mầm và sự phát triển tạo cây hoàn chỉnh (Hình 2).

Ngoài ra, các môi trường nghiên cứu sau 60 ngày nuôi cấy có hiện tượng một số hạt nảy mầm và phát triển đến giai đoạn protocorm có thể không phát triển tiếp, đen dần và chết. Tỷ lệ chết cũng phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy và chiếm từ 6,2 - 31%. Tỷ lệ hạt nảy mầm vẫn duy trì ở trạng thái protocorm còn lại khá cao, chiếm 24,3 đến 62%. Các protocorm này nếu cấy chuyển sang môi trường mới thì vẫn tạo chồi nhưng tỷ lệ rất thấp. Các kết quả này cũng tương tự như các quan sát của Chen và đồng tác giả (2015) [21], cho rằng trong môi trường RE protocorm của *P. spicerianum* được hình thành, có màu trắng và phát triển nhưng không tạo được chlorophyll và sau đó chuyển sang nâu và chết. Như vậy, không phải 100% hạt Lan hài khi nảy mầm đều phát triển thành chồi và cây hoàn chỉnh cho thấy có nhiều trở ngại trong việc nhân giống Lan hài.

Bảng 4. Ảnh hưởng của môi trường khoáng bổ sung các chất ĐHST đến sự biệt hóa chồi của protocorm

Môi trường	Môi trường nền + BAP (mg/L) + NAA (mg/L)	Sau 40 ngày nuôi cấy		Sau 60 ngày nuôi cấy	
		Tỷ lệ tạo chồi (%)	Tỷ lệ chết (%)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Tỷ lệ chết (%)
ĐC1	MS + 0 + 0	16,3 ^b	15,9 ^{ab}	19,3 ^c	29,2 ^a
MT2	MS + 1,0 + 0	20,2 ^b	9,6 ^{ab}	30,3 ^{bc}	19,0 ^{ab}
MT4	MS + 2,0 + 0	25,2 ^b	15,4 ^{ab}	36,3 ^b	17,2 ^{ab}
MT7	VW + 1,0 + 0	21,9 ^b	2,5 ^b	31,8 ^{bc}	6,2 ^b
MT8	VW + 2,0 + 0	25,5 ^b	14,3 ^{ab}	36,9 ^b	31,0 ^a
NC6	VW + 2,0 + 0,5	27 ^b	9,4 ^{ab}	42,1 ^{ab}	24,6 ^{ab}
P5	VW + 1,0 + 0,5 + PH+ BH + CW	48,2 ^a	29,2 ^a	50,1 ^a	25,6 ^a

CW+ PH+ BH: Nước dừa 100 ml/L + 40 g/L khoai tây + 30 g/L chuối



Hình 2. Biệt hóa chồi từ protocorm trên môi trường P5 (VW + BAP 1,0 mg/L + NAA 0,5 mg/L + Nước dừa 100 ml/L + Khoai tây 40 g/L + Chuối 30 g/L): (a) Hình thành lá mầm, (b) Cây con có lá xanh sau 30 ngày, (c) Cây hoàn chỉnh sau 60 ngày

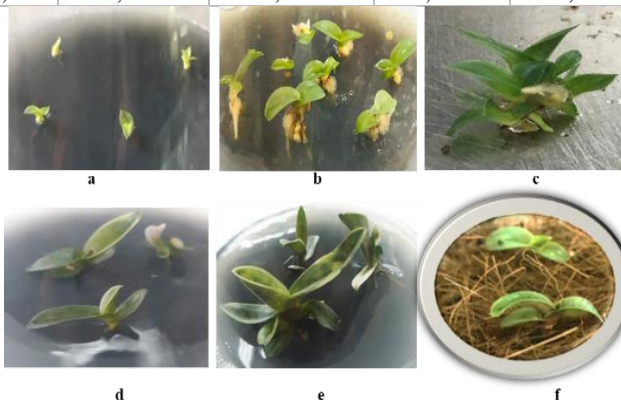
Các nghiên cứu về môi trường phù hợp cho sự nảy mầm ở Lan hài đã được nhiều tác giả báo cáo. Chuối hay khoai tây được bổ sung vào môi trường có thể thúc đẩy hoặc ức chế sự nảy mầm của hạt *Paphiopedilum* và các giống được lai tạo. Sự nảy mầm của ba loài *P. bellatulum*, *P. delenatii* và *P. Primulinum* có thể được thúc đẩy khi bổ sung 20 g/L khoai tây, trong khi bổ sung chuối 20 g/L lại làm giảm sự nảy mầm của *P. bellatulum*, *P. delenatii* và *P. primulinum* [4]. Ngược lại, theo Zeng và đồng tác giả (2012), tỷ lệ nảy mầm của hạt không có sự khác biệt trên môi trường ½MS có chứa khoai tây và môi trường ½MS có chứa 75 đến 100 g/L dịch chiết chuối so với môi trường không bổ sung chất hữu cơ nào [2].

3.3. Ảnh hưởng của BAP và NAA đến khả năng tái sinh chồi và sinh trưởng của cây con Lan hài Đốm *in vitro*

Các môi trường nghiên cứu VW bổ sung BAP riêng rẽ từ 1,0 - 4,0 mg/L hay bổ sung kết hợp BAP nồng độ từ 1,0 - 2,0 mg/L và NAA 0,25 - 0,5 mg/L (NC1- NC8) đã có ảnh hưởng khác biệt so với đối chứng (ĐC2) lên sự tái sinh chồi và sinh trưởng của cây con Lan hài Đốm *in vitro* (Bảng 5).

Bảng 5. Ảnh hưởng của BAP và NAA đến khả năng tái sinh chồi và sinh trưởng của cây con Lan hài Đốm *in vitro* sau 60 ngày

Môi trường	BAP (mg/L)	NAA (mg/L)	Số chồi/mẫu	Số lá/chồi	Dài lá (cm)	Số rễ/chồi	Đặc điểm chồi
ĐC	0	0	1,00 ^b	1,80 ^b	0,55 ^c	0,50 ^b	Lá bé, vàng nhạt
NC1	1,0	0	1,00 ^b	2,50 ^b	0,76 ^{bc}	1,00 ^{ab}	Lá bé, xanh đậm
NC2	2,0	0	1,67 ^a	2,67 ^b	0,77 ^{bc}	1,00 ^b	Lá non, xanh nhạt
NC3	3,0	0	1,00 ^b	2,50 ^b	0,75 ^{bc}	1,00 ^{ab}	Lá mỏng, vàng nhạt
NC4	4,0	0	1,00 ^b	3,00 ^b	1,15 ^{ab}	1,50 ^{ab}	Lá dày, tím nâu
NC5	1,0	0,25	1,00 ^b	2,00 ^b	0,93 ^{bc}	1,00 ^{ab}	Lá bé, vàng nhạt
NC6	1,0	0,5	1,40 ^{ab}	2,33 ^b	1,15 ^{ab}	1,31 ^{ab}	Lá mỏng, xanh nhạt
NC7	2,0	0,25	1,50 ^{ab}	2,50 ^b	1,25 ^{ab}	1,50 ^{ab}	Lá xanh nhạt
NC8	2,0	0,5	2,00 ^a	3,50 ^a	1,35 ^a	2,00 ^a	Lá xanh đậm



Hình 3. Sinh trưởng của cây Lan hài Đốm *in vitro* trên môi trường bổ sung BAP và BAP kết hợp với NAA: (a) Chồi ban đầu, (b) Chồi sinh trưởng tốt sau 30 ngày, (c) Sự tạo đa chồi trên môi trường bổ sung BAP 2 mg/L + NAA 0,5 mg/L, (d) Sự tái sinh chồi trên môi trường BAP 2 mg/L, (e) Chồi sinh trưởng tốt trên môi trường bổ sung BAP sau 90 ngày, (f) Cây Lan hài Đốm ra cây ở vườn ươm sau 60 ngày

Trong số các chỉ tiêu sinh trưởng thì số lá/chồi thay đổi không lớn giữa các môi trường nuôi cấy khác nhau vì các lá già sẽ chết và rụng đi song song với quá trình ra lá mới. Ở môi trường ĐC không bổ sung BAP và NAA cho thấy mẫu không tạo đa chồi, chồi sinh trưởng kém, cây nhỏ, lá bé và vàng nhạt. Với các môi trường chỉ bổ sung BAP với nồng độ từ 1,0 - 4,0 mg/L (NC1 - NC4), các chỉ tiêu sinh trưởng chồi như số lá/chồi, chiều dài lá, số rễ đều đạt cao hơn so

với môi trường đối chứng. Tuy nhiên, chỉ có môi trường NC2 (BAP 2,0 mg/L) là có sự tạo đa chồi, thu được chồi bên tái sinh, số chồi/mẫu đạt 1,67 chồi/mẫu, chồi sinh trưởng tốt, số lá đạt 2,67 lá/chồi, chiều dài lá đạt 0,77 cm, và số rễ/chồi đạt 1,0, lá non có màu xanh nhạt (Bảng 5, Hình 3c). Môi trường NC3 và NC4 bổ sung nồng độ BAP tăng lên tương ứng là 3,0 và 4,0 mg/L mặc dù có các chỉ tiêu sinh trưởng tăng nhưng không có sự đa chồi, số chồi/ mẫu là 1,0. Điều này chứng tỏ bổ sung BAP nồng độ cao đã ức chế tái sinh chồi.

Đối với các môi trường bổ sung kết hợp BAP và NAA đã có ảnh hưởng khác biệt nhau rõ rệt so với môi trường ĐC2 lên sự sinh trưởng của chồi non Lan hài Đốm. Ở môi trường NC6 đã có sự đa chồi, chồi sinh trưởng tốt. Khi tăng nồng độ BAP lên 2 mg/L (NC7 và NC8) kết hợp với NAA từ 0,25 đến 0,5 mg/L đã có ảnh hưởng tích cực đến sự tái sinh chồi và sinh trưởng của chồi. Các chỉ tiêu sinh trưởng đều tăng cao hơn so với đối chứng và môi trường NC5 và NC6. Môi trường NC8 đã có ảnh hưởng tốt nhất lên sinh trưởng và phát triển của chồi, số chồi/mẫu đạt cao nhất (2,0 chồi/mẫu), số lá/chồi đạt 3,5, dài lá 1,35 cm, chồi to, lá xanh đậm và dày (Hình 3d). Kết quả về số chồi/mẫu trên môi trường NC8 trong nghiên cứu này cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Huang và đồng tác giả (2000), đồng thời tương tự với các kết quả nghiên cứu của Chen và đồng tác giả (2004) cho thấy rằng trong nhiều trường hợp Lan hài hình thành chồi ít hơn so với các loại hoa lan khác [5]. Ngoài ra, khi quan sát trong quá trình nuôi cấy chúng tôi thấy một số cây xuất hiện các lá bị trắng hoặc tím ở đầu lá (Hình 3d), có thể đây là các biến dị xuất hiện do ảnh hưởng của thành phần môi trường nuôi cấy *in vitro* với nhiều yếu tố, trong đó có các chất kích thích sinh trưởng và thời gian nuôi cấy dài.

4. Kết luận

Chúng tôi đã nghiên cứu thành công một số yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả của việc nhân giống Lan hài Đốm bằng phương pháp gieo hạt. Kết quả cho thấy hạt Lan hài Đốm nuôi cấy trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS hoặc $\frac{1}{2}$ VW cho tỷ lệ hạt nảy mầm cao là 82,5% và 80%, thời gian nảy mầm là 37,5 đến 40 ngày. Môi trường phù hợp cho biệt hóa và phát triển của hạt nảy mầm là môi trường P5 có tỷ lệ tạo chồi đạt nhất (50,1%). Môi trường phù hợp cho tái sinh chồi và sinh trưởng của cây con là môi trường MS bổ sung BAP 2,0 mg/L, NAA 0,5 mg/L. Đây là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo về nhân giống *in vitro* Lan hài ở Việt Nam.

Lời cảm ơn

Công trình được hoàn thành nhờ sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp Đại học, mã số ĐH2020-TN06-06.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] L. V. Averyanov, P. Cribb, P. K. Loc, and N. T. Hiep, *Slipper orchids of Vietnam*, Compass Press Limited, The Royal Botanic Gardens, Kew, UK, 2003.
- [2] S. J. Zeng, K. L. Wu, and J. A. Teixeira da Silva, "Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid," *Sci Horti.*, vol. 138, pp. 198-209, 2012.
- [3] Y. Zhang, K. Wu, J. Zhang, R. Deng, J. Duan, J. A. Teixeira da Silva, W. Huang, and S. Zeng, "Embryo development in association with a symbiotic seed germination *in vitro* of *P. armeniacum* S. C. Chen et F. Y. Liu.," *Scientific Reports*, vol. 5, p. 16356, 2015, doi: 10.1038/srep16356.
- [4] S. Zeng, W. Huang, K. Wu, J. Zhang, J. Duan, and J. d. Silva, "*In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchids," *Crit Rev Biotechnol.*, vol. 36, no. 3, pp. 521-534, 2016.
- [5] T. Y. Chen, J. T. Chen, and W. C. Chang, "Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *Paphiopedilum* orchids," *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, vol. 76, pp. 11-15, 2004.
- [6] T. H. Y. Nguyen, H. M. Chu and T. P. Do, "Using morphological characteristics and DNA barcode to identify the *Paphiopedilum emersonii*," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 225, no.11, pp. 18-25, 2020.

- [7] H. T. Vu, Q. L. Vu, T. D. Nguyen, N. Tran, C. Nguyen, P. N. Luu, D. D. Tran, T. K. Nguyen, and L. Le, "Genetic Diversity and Identification of Vietnamese *Paphiopedilum* Species Using DNA Sequences," *Biology*, vol. 9, no. 1, p. 9, 2020, doi: 10.3390/biology9010009.
- [8] T. G. Hoang, Q. T. Nguyen, H. T. Mach, and T. T. H. Do, "Study on *in vitro* Propagation and Culture of *Paphiopedilum hangianum* collected in Vietnam," *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, vol. 8, no. 2, pp. 194 -201, 2010.
- [9] T. T. Nguyen, T. D. Nguyen, T. X. Dao, T. D. Chu, and X. B. Ngo, "*In vitro* Propagation of a Vietnam Endemic Lady's Slipper Orchid (*Paphiopedilum vietnamense* O.Gruss & Perner)," *Journal of Horticulture and Plant Research*, vol. 1, pp. 1-8, 2018.
- [10] T. N. Duong, T. T. T. Phan, H. V. Nguyen, T. T. T. Dang, V. K. Dinh, V. B. Nguyen, and T. V. Tran, "A wounding method and liquid culture in *Paphiopedilum delenatii* propagation," *Propagation of Ornamental Plants*, vol. 5, pp. 158-163, 2005.
- [11] T. N. Duong, T. T. T. Dang, T. D. Nguyen, Q. L. Vu, T. H. Nguyen, T. T. V. Kiem, and C. C. Chendanda, "*In vitro* stem elongation of *Paphiopedilum Delenatii* Guillaumin and shoot regeneration via stem node culture," *Propagation of Ornamental Plants*, vol. 7, pp. 29-36, 2007.
- [12] Q. L. Vu, K. C. Le, T. T. Hoang, T. H. Vu, H. Tran, and T. N. Duong, "Effects of shoot tip removal, wounding manipulation, and plant growth regulators on shoot regeneration and plantlet development in *Paphiopedilum* species," *Sci. Hortic.*, vol. 256, pp. 108648, 2019.
- [13] H.T. Khuat, "Studying on genetic diversity of native *Paphiopedilum concolor* species in Vietnam," *Vietnam Journal of Agricultural Science and Technology*, vol. 3, pp. 70-77, 2009.
- [14] T. T. Nguyen, T. D. Nguyen, T. N. Pham, T. D. Chu, and X. B. Ngo, "Study on invitro propagation of sliper Orchid (*Paphiopedilum concolor*)," *Science and Technology Journal of Agriculture and Rural Development*, vol. 2, pp. 79-83, 2017.
- [15] T. L. Vu and T. T. T. Tran, "Regeneration of *Paphiopediullum concolor* from young bud and seeds," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 207, no. 14, pp. 113-119, 2019.
- [16] T. Murashige and F. Skoog, "A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures," *Physiol Plant*, vol. 15, pp. 473-497, 1962.
- [17] E. F. Vacin and E. Went, "Some pH changes in nutrient solutions," *Bot Gaz*, vol. 110, pp. 605-61, 1949.
- [18] X. L. Li, C. Y. Huang, Q. Song, J. Y. Zhou, and X. G. Wang, "*In vitro* asymbiotic germination and propagation of *Paphiopedilum concolor* (Lindl.) Pfitz.," *Plant Science Journal*, vol. 34, no. 1, pp. 127-134, 2016.
- [19] T. N. Duong, T. T. T Dang, Q. L. Vu, T. D. Nguyen, V. K. Dinh, and T. V. Tran, *Micropropagation of Paphiopedilum delenatii via stem node culture*, Vietnam – Korea International Symposium, Bio-Technology & Bio-System Engineering, 2005, pp. 184-190.
- [20] S. Rittirat, S. Klaocheed, K. Thammasiri, and S. Prasertsongs, "*In vitro* Propagation and Forest Reestablishment of *Cymbidium finlaysonianum* Lindl., an Endangered Medicinal Orchid," *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, vol. 15, no.10, pp. 711-724, 2017.
- [21] Y. Chen, U. M. Goodale, X. Fan, and J. Y. Gao, "Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Paphiopedilum spicerianum*: An orchid with an extremely small population in China," *Global Ecology and Conservation*, vol. 3, pp. 367-378, 2015.