

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG NHÂN GIỐNG LAN HÀI VIỆT NAM (*Paphiopedilum vietnamese*) BẰNG KỸ THUẬT *IN VITRO*

Nguyễn Thị Tình^{1*}, Nguyễn Tiến Dũng², Bùi Tri Thức²,
Dương Thị Thu Hoài², Trần Trung Kiên², Ngô Xuân Bình², Trần Ngọc Hùng³

TÓM TẮT

Lan hài Việt Nam (*Paphiopedilum vietnamese*) là một trong những loài lan đặc hữu của Việt Nam. Quả thụ phấn sau 9 tháng được lựa chọn để tiến hành thí nghiệm. Phôi hạt nuôi nảy mầm trên môi trường MS bổ sung thêm 30 g/l đường, 1 g/l than hoạt tính, 5,5 g/l agar, 150 ml/l nước dừa. Nhân nhanh loài lan hài Việt Nam từ phôi hạt cho thấy khả năng tạo đa chồi tốt khi bổ sung chất điều tiết sinh trưởng BAP 4 mg/l hoặc BAP 4 mg/l kết hợp Kinetin 0,6 mg/l vào nền môi trường MS có đường 30 g/l, than hoạt tính 1 g/l, agar 5,5 g/l, nước dừa 150 ml/l, thu được 86,2 chồi, chiều cao chồi trung bình đạt 2,71 cm, chất lượng chồi tốt. Rễ lan hài Việt Nam phát sinh tốt nhất trong điều kiện môi trường MS bổ sung đường 30 g/l, agar 5,5 g/l, nước dừa 150 ml/l và NAA hoặc IAA nồng độ 1 mg/l.

Từ khóa: BAP, lan hài Việt Nam, NAA, IAA, *in vitro*, tái sinh chồi.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam là quốc gia có sự đa dạng các loài lan hài cao nhất trên thế giới với 22 loài trên tổng số khoảng 80 loài được phát hiện [1]. Hiện nay, tất cả các loài lan hài của Việt Nam đang trong tình trạng từ nguy cấp đến tuyệt chủng ngoài tự nhiên [2]. Trong số các loài không tìm thấy ngoài tự nhiên phải kể đến lan hài Việt Nam. Lan hài Việt Nam có khu phân bố hẹp, loài được xác định tìm thấy ở khu vực Mỏ Ba thuộc huyện Đồng Hỷ, tỉnh Thái Nguyên vào năm 1998 do những người buôn lan phát hiện [1]. Khu vực Mỏ Ba có điều kiện lập địa là rừng nguyên sinh trên núi đá vôi, có độ cao từ 150 - 450 m so với mặt nước biển. Lan hài Việt Nam là loài có giá trị thẩm mỹ cao, cũng là loài bị săn lùng, khai thác mất kiểm soát lớn nhất trong số các loài lan hài của Việt Nam. Lan hài Việt Nam được xếp vào Sách Đỏ Việt Nam (2007) [2] với phân hạng EW (tuyệt chủng ngoài tự nhiên), liệt kê vào phụ lục 1 của Công ước CITES (Danh mục thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm nhóm I), nghiêm cấm khai thác và sử dụng vì mục đích thương mại [3].

Ở Việt Nam, nhân giống lan hài đã có một số nghiên cứu của: Nhut và cs (2007); Nguyễn Thị Cúc và cs (2014); Hoàng Thị Giang và cs (2010); Ngô Thị Nguyệt (2013) [4, 5, 6, 7]. Tuy nhiên các nghiên cứu được thực hiện trên đối tượng lan hài Hồng, hài Vẻ nữ vàng, hài Gấm, hài Hạng, lan hài Việt Nam chưa được nghiên cứu nhân giống nhiều. Loài này có đặc thù tỷ lệ nảy mầm của hạt trong tự nhiên thấp. Trên thế giới nhân giống các loài lan hài đã được thực hiện với nhiều phương pháp khác nhau như gieo hạt, tách chồi, những phương pháp này có hệ số nhân giống rất thấp, chất lượng cây giống không đồng đều [8].

Chi Lan hài *Paphiopedilum* được xác định là loại cây khó nhân giống *in vitro*, nhất là trong quá trình tái sinh cây [9]. Gần đây, phương pháp nhân giống *in vitro* lan hài được quan tâm, trong đó hạt và tế bào soma (PLBs) được sử dụng phổ biến để nghiên cứu nhân giống *Paphiopedilum*. Một số nghiên cứu cho thấy lan hài có khả năng nhân giống *in vitro* từ các bộ phận khác nhau như từ mô sẹo, chồi và lá [10], chồi đỉnh [11], đốt mầm [8, 4, 12, 9].

Lan hài Việt Nam rất cần bảo tồn và khôi phục nguồn gen. Các phương pháp nhân giống được thử nghiệm trong đó có phương pháp *in vitro*. Nghiên cứu được thực hiện từ hạt. Hạt lan có nguồn gốc từ nguồn hạt phấn và nhụy của chính cá thể. Nghiên cứu nhằm khắc phục những tồn tại về khả năng nhân

¹ Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

² Trường Đại học Nông lâm, Đại học Thái Nguyên

³ Viện Nghiên cứu Rau quả

* Email: nguyenthitinh@tuaf.edu.vn

giống của các loài lan hài trước đó như khả năng tái sinh thấp, hệ số nhân chồi thấp. Đồng thời góp phần bảo tồn và nhân nhanh loài hoa đặc hữu có giá trị của Việt Nam.

2. ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Lan hài Việt Nam (*Paphiopedilum vietnamense*).
- Hạt lan hài Việt Nam 9 tháng tuổi.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

- Thành phần khoáng là các loại hóa chất của hãng Merck.
- Các chất kích thích sinh trưởng (BAP, Kinetin, NAA, IAA) có nguồn gốc của hãng Sigma.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Khử trùng vật liệu và nuôi cấy tạo chồi từ phôi hạt:

Khử trùng mẫu: Quả được xử lý trong dung dịch cồn 70° trong 1 phút và tráng sạch bằng nước cất vô trùng nhiều lần. Tiếp tục nhúng trong cồn và hơ nhanh trên ngọn lửa đèn cồn, tiến hành tách hạt khỏi phần vỏ quả. Các hạt thu được, pha vào 20 ml nước cất khử trùng. Mỗi bình nuôi cấy hút 1 ml dung dịch hạt lan hài Việt Nam, gieo đều trên bề mặt môi trường nuôi cấy.

Ảnh hưởng của môi trường đến khả năng nảy mầm của hạt:

Tiến hành gieo hạt trên nền môi trường dinh dưỡng MS (Murashige và skoog, 1962), môi trường B5 (Gamborg's, 1976), môi trường WPM (Lloyd và Mc Cown, 1980), môi trường Knudson C (Morel, 1965), môi trường VW (Vacin và Went, 1949) được thể hiện ở bảng 1.

Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân nhanh:

Hạt lan hài Việt Nam sau khi nảy mầm, đạt kích thước chồi từ 1- 2 cm được cấy chuyển qua môi trường nhân nhanh. Môi trường nhân nhanh MS + đường 30 g/l + than hoạt tính 1 g/l + agar 5,5 g/l + nước dừa 150 ml/l bổ sung BAP với các nồng độ 0, 1, 2, 3 và 5 mg/l.

Ảnh hưởng của BAP và Kinetin đến khả năng nhân nhanh:

Hạt lan hài Việt Nam sau khi nảy mầm, đạt kích thước chồi từ 1 - 2 cm được cấy chuyển qua môi trường nhân nhanh. Môi trường MS + đường 30 g/l + than hoạt tính 1 g/l + agar 5,5 g/l + nước dừa 150 ml/l bổ sung BAP 2 mg/l kết hợp với các nồng độ Kinetin từ 0; 0,1; 0,3; 0,5 và 1 mg/l.

Ảnh hưởng của NAA đến khả năng tạo cây hoàn chỉnh:

Các chồi lan hài Việt Nam có chiều cao từ 3 - 4 cm tiến hành cấy chuyển sang môi trường MS + đường 30 g/l + agar 5,5 g/l + nước dừa 150 ml/l + NAA từ 0; 0,4; 0,6; 1,0 và 1,5 mg/l.

Các bình nuôi cấy phôi và nhân nhanh chồi được nuôi dưỡng trong điều kiện ánh sáng với cường độ 2.000 lux và thời gian chiếu sáng 16 giờ sáng/8 giờ tối, độ ẩm 60 - 65%, nhiệt độ phòng 25°C.

2.3. Xử lý số liệu

Mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần, được tiến hành trên 30 bình (n = 30). Số liệu được xử lý bằng Excel 2010 và phần mềm thống kê ANOVA.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của môi trường tới khả năng nảy mầm của hạt lan hài Việt Nam

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường tới khả năng nảy mầm của hạt lan hài Việt Nam sau 6 tháng nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy	Tỷ lệ bình mẫu tái sinh (%)	Số chồi/bình (chồi)	Chiều cao chồi (mm)	Khối lượng tươi cụm chồi (mg)
MS cơ bản	53,2	8,3	3,3	325
B5 cơ bản	37,4	4,7	1,6	171
WPM cơ bản	8,1	1,3	1,3	137
Knudson cơ bản	47,2	3,7	1,8	129
Phong lan cơ bản	44,6	5,7	1,7	216
VW cơ bản	46,7	7,3	1,67	247
CV%	2,07	1,08	0,4	62,2
LSD _{0,05}	3,6	0,64	1,09	16,7

Từ kết quả nghiên cứu cho thấy: Nghiên cứu khả năng tái sinh chồi của lan hài Việt Nam trên 6 nền môi trường nuôi cấy thì nền môi trường MS cho tỷ lệ tái sinh phôi hạt cao nhất đạt 53,2%. Các nền môi trường Knudson C, Phong lan, VW hạt nảy mầm cao dao động từ 47,2%, 44,6% và 46,70% sau 6 tháng nuôi cấy, tiếp đó là nền môi trường B5 cho tỷ lệ tái sinh là 37,4% và thấp nhất là môi trường WPM cơ bản cho tỷ lệ tái sinh chồi 8,1%. Chiều cao chồi cao nhất trên môi trường MS đạt trung bình là 3,3 cm sau 6 tháng nuôi cấy phôi, tiếp đó là môi trường B5 cơ bản, môi trường Knudson C, môi trường phong lan, môi trường VW lần lượt đạt chiều cao chồi là 1,6; 1,8; 1,7 và 1,67 cm trên độ đồng phôi nuôi cấy. Khối lượng cụm chồi đạt giá trị cao nhất trên nền môi trường MS (325 mg/cụm chồi) và tiếp đó là nền môi trường VW đạt 247 mg/cụm chồi.

Lan hài được tái sinh chủ yếu bằng hạt và thân khí sinh, quả sau khi chín thì bung ra phát tán hạt vào không khí, khi hạt gặp nấm cộng sinh thì mọc thành cây con [6]. Ở Việt Nam chưa có nhiều công bố nhân giống lan hài, các công trình đã công bố khả năng tái sinh thấp. Để giải quyết bài toán tái sinh ở lan hài Việt Nam, nghiên cứu này đã đi tìm hiểu môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy là giá thể cung cấp chất dinh dưỡng giúp tế bào phân chia, hình thành các cơ quan của thực vật. Trong nuôi cấy một số chi *Paphiopedilum* nhiều loại môi trường đã được sử dụng, bao gồm MS, RE, V1 [6, 9] và Knudson C, Terrestrial orchid medium (BM), Vacin và Went

(VW), Nitsch và Nitsch (N) [13]. Bên cạnh đó môi trường nền còn ảnh hưởng đến số chiều cao vào khối lượng cụm chồi [13, 14, 12, 9]. Trong nghiên cứu này, sự khác biệt còn biểu hiện ở tỷ lệ phôi nảy mầm trong bình, chiều cao chồi, khối lượng cụm chồi trên các nền môi trường khác nhau. Đặc biệt là chiều cao chồi và khối lượng cụm chồi, đây là những tiêu chí quan trọng để đánh giá sức sinh trưởng của phôi sau khi tái sinh và sự thích hợp của môi trường nuôi cấy.

Các kết quả nghiên cứu của Zeng và cs (2012)[12] cho thấy, sự nảy mầm của hạt giống chi *Paphiopedilum* cao nhất là trên môi trường Vacin và Went (VW, Vacin và Went, 1949). Long và cs, (2010) [14] đã khẳng định sự nảy mầm của *P. villosum* var. *densissimum* cao hơn trên VW so với môi trường 1/4 MS, RE hoặc KC. Từ kết quả nghiên cứu trước đó và kết quả nghiên cứu này cho thấy mỗi loài lan hài Việt Nam thích hợp với môi trường nuôi cấy giàu dinh dưỡng, do đó đã lựa chọn môi trường MS làm môi trường nền thử nghiệm các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng nhân nhanh chồi lan hài Việt Nam

Lan hài là loài sinh trưởng và phát triển chậm, hệ số nhân chồi trong điều kiện *in vitro* rất thấp, vì vậy để nâng cao hệ số nhân chồi nghiên cứu này đã phối hợp với một số chất kích thích sinh trưởng nhóm cytokine để nâng cao hệ số nhân nhanh chồi lan hài Việt Nam.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân nhanh chồi lan hài Việt Nam sau 60 ngày nuôi cấy

Công thức thí nghiệm	Số chồi thí nghiệm (chồi)	Số chồi sau 60 ngày nuôi cấy (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái chồi
CT1 (ĐC) 0,0 mg/l	30	42,5	2,31	Xanh mập
CT2 1,0 mg/l	30	67,7	2,42	Xanh mập
CT3 2,0 mg/l	30	69,6	2,48	Xanh mập
CT4 3,0 mg/l	30	71,3	2,70	Xanh mập
CT5 4,0 mg/l	30	78,4	3,01	Xanh mập
CT6 5,0 mg/l	30	81,2	2,68	Vàng, gầy
CV%		3,4	0,8	
LSD _{0,05}		2,7	0,16	

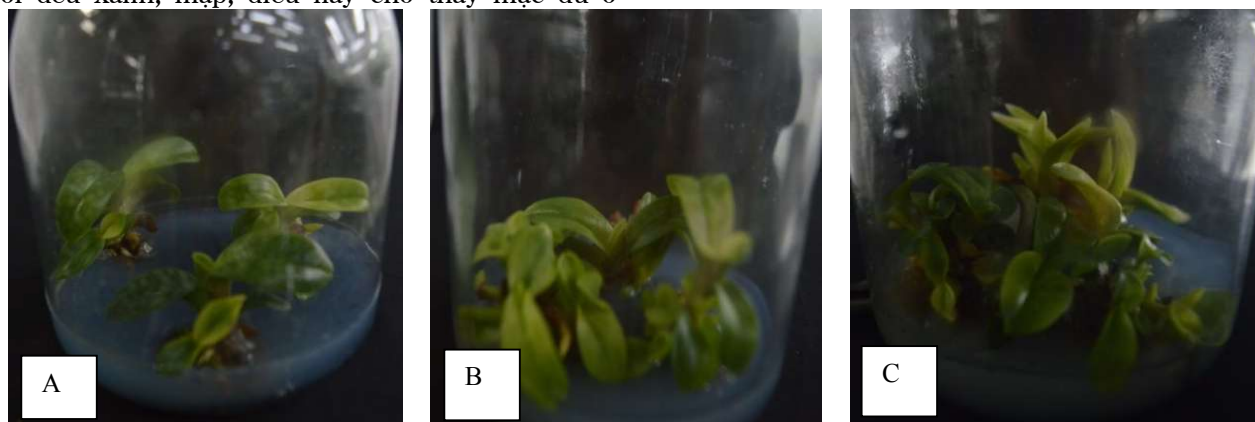
Bảng 2 cho thấy, nồng độ BAP có ảnh hưởng đến sự phân hoá chồi, số chồi sau 60 ngày nuôi cấy chồi thu được ở công thức 6 (5,0 mg/l) là 81,2 chồi, tiếp đó là công thức 5, công thức 4 số chồi thu được là 78,4 và 71,3 chồi, tiếp theo là công thức 3 và công thức 2 số

chồi lần lượt thu được là 69,6 và 67,7 chồi. Thấp nhất là công thức đối chứng không bổ sung BAP.

Chiều cao chồi và hình thái chồi là 2 chỉ tiêu đánh giá chất lượng chồi giai đoạn sau nhân nhanh. Ở chỉ tiêu chiều cao chồi cho thấy chiều cao chồi đạt

giá trị cao nhất ở công thức 5 (4 mg/l) tiếp đó là công thức 4 và 6 lần lượt là 2,7 cm và 2,68 cm, thấp nhất vẫn là công thức 1 không bổ sung BAP. Ở chỉ tiêu hình thái cho thấy công thức 6 chất lượng chồi thấp, chồi vàng, gầy. Các công thức còn lại cho thấy chồi đều xanh, mập, điều này cho thấy mặc dù ở

nồng độ 5 mg/l BAP bổ sung vào môi trường nhân nhanh cho thấy số lượng chồi tạo ra cao nhưng chất lượng chưa được tốt để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo. Do đó lựa chọn nồng độ BAP 3 - 4 mg/l để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Ảnh hưởng của hàm lượng BAP đến khả năng nhân nhanh lan hài Việt Nam sau 60 ngày nuôi cấy (A. Đối chứng không bổ sung BAP; B: nồng độ BAP 2 mg/l; C: nồng độ BAP 4 mg/l).

Để nhân giống chi *Paphiopedilum*, nhiều nghiên cứu đã sử dụng chất kích thích sinh trưởng nhằm kích thích sự phân chia tế bào và phân hóa chồi từ mô sẹo hoặc từ các cơ quan, tạo phôi vô tính, tăng cường phát sinh chồi phụ [4]. Sự tương quan của nồng độ BAP tăng cường số chồi trong nuôi cấy *Paphiopedilum villosum* var. *densissimum* và *Paphiopedilum armeniacum* đã được khảo sát [9]. Ở nồng độ BA 1 - 3 mg/l đều thu được hệ số nhân chồi gia tăng đáng kể. Tuy nhiên, ở với BA 5 mg/l thu được hệ số nhân chồi thấp hơn. Sự giảm sút hệ số nhân chồi có thể do đặc điểm nổi bật trong nuôi cấy hình thành chồi trực tiếp từ phôi hạt cần thông qua giai đoạn protocorm, do đó BA ở nồng độ cao hạn chế

sự nảy mầm của hạt và ức chế sự hình thành protocorm [13, 4, 9]. Hệ số nhân chồi và chất lượng chồi thấp thể hiện rõ ở nồng độ BA 5 mg/l, điều này đã được ghi nhận bởi Zeng và cs (2013) [9]. Gần đây, BA 2 mg/l bổ sung vào môi trường MS nuôi cấy lan hài *P. delenatii*, thu được tỷ lệ tái sinh chồi là 75% sau 30 ngày [5, 4]. Từ kết quả đạt được cho thấy nồng độ BA dao động từ 2 - 3 mg/l thích hợp cho nhân nhanh chồi lan hài Giáp.

Từ phân tích ở trên đã tiến hành lựa chọn nồng độ BAP 4 mg/l bổ sung vào môi trường nhân nhanh lan hài Việt Nam.

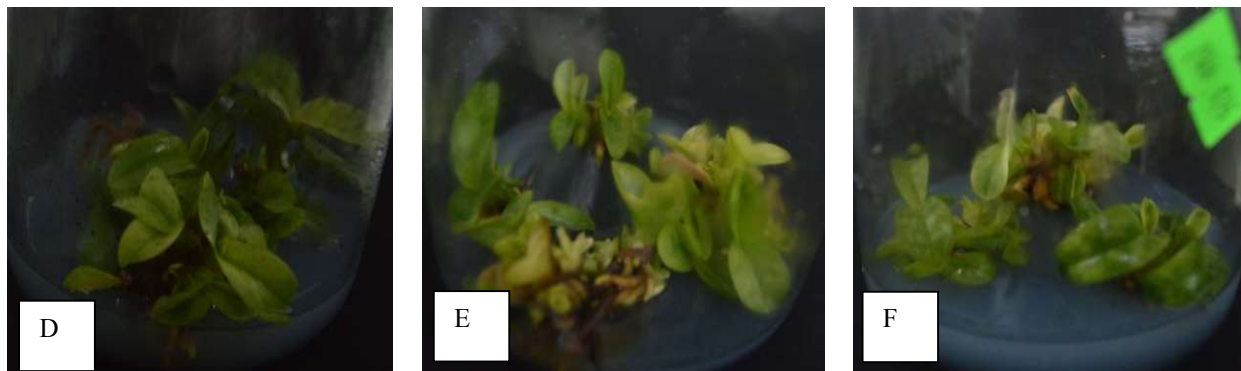
3.3. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP (4 mg/l) và Kinetin đến khả năng nhân nhanh lan hài Việt Nam

Bảng 3. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP (4 mg/l) và Kinetin đến khả năng nhân nhanh lan hài Việt Nam sau 60 ngày nuôi cấy

Công thức thí nghiệm	Số chồi thí nghiệm (chồi)	Số chồi sau 60 ngày nuôi cấy (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái chồi
CT1 - ĐC (0,0 mg/l)	30	80,0	2,47	Xanh mập
CT2 (0,1 mg/l)	30	85,6	2,53	Xanh mập
CT3 (0,2 mg/l)	30	87,7	2,64	Xanh mập
CT4 (0,4 mg/l)	30	95,4	2,74	Xanh mập
CT5 (0,6 mg/l)	30	97,2	2,71	Xanh mập
CT6 (0,8 mg/l)	30	85,4	2,41	Vàng, mập
CT7 (1,0 mg/l)	30	77,3	2,34	Vàng, mập
CV%		2,6	0,9	
LSD _{0,05}		3,04	0,3	

Chất điều hoà sinh trưởng được sử dụng trong nuôi cấy loài *Paphiopedilum* bao gồm auxin (2,4-D, IBA và NAA) và cytokinins (BA, TDZ, Zeatin và Kinetin). Khả năng phát sinh hình thái của loài *Paphiopedilum* phụ thuộc vào loại kích thích sinh trưởng, nồng độ và đặc điểm di truyền [14, 12, 9]. Cho đến nay, sự hạn chế trong việc nhân nhanh của

các loài *Paphiopedilum* đã được biết đến, nguyên nhân do khả năng hấp thụ chất kích thích sinh trưởng ngoại sinh hạn chế. Để nâng cao hệ số nhân chồi lan hài Việt Nam, nghiên cứu này đã tiến hành thử nghiệm nồng độ BAP 4 mg/l kết hợp với nồng độ Kinetin từ 0 - 1 mg/l. (Bảng 3).



Hình 2. Ảnh hưởng của BAP 4 mg/l kết hợp với các nồng độ Kinetin đến khả năng nhân nhanh lan hài Việt Nam sau 60 ngày nuôi cấy (A. Đối chứng không bổ sung Kinetin; B: nồng độ Kinetin 0,4 mg/l; C: nồng độ Kinetin 0,6 mg/l).

Sự tối ưu của môi trường nuôi cấy các loài *Paphiopedilum* thể hiện ở hệ số nhân, chiều cao và chất lượng chồi tạo ra, với nồng độ BA (4 mg/l) kết hợp Kinetin từ 0,0 - 1,0 mg/l thu được hệ số nhân chồi cao hơn so với đối chứng (CT1, BA 4 mg/l) ở nồng độ từ 0,1 - 0,6 mg/l số chồi thu được lần lượt là 97,2 chồi ở nồng độ Kinetin 0,6 mg/l; 95,4 chồi ở nồng độ Kinetin bổ sung 0,4 mg/l, 87,7 chồi ở nồng độ 0,2 mg/l. Tương tự, chất lượng chồi đạt mức tốt ở CT1 đến công thức CT5. Ở CT6 và CT7 chất lượng chồi kém. Điều này cho thấy rằng Kinetin ảnh hưởng đến quá trình nhân chồi, cụ thể ở nồng độ BAP 4 mg/l kết hợp với Kinetin thay đổi nồng độ từ 0 - 1

mg/l. Trong nghiên cứu này cho thấy BAP 4 mg/l kết hợp Kinetin nồng độ 0,4 - 0,6 mg/l cho kết quả nhân chồi tốt nhất.

3.4. Ảnh hưởng của α -NAA đến khả năng ra rễ tạo cây hoàn chỉnh của lan hài Việt Nam

Tạo cây hoàn chỉnh thông qua quá trình ra rễ được đáp ứng bởi các kích thích sinh trưởng cảm ứng rễ, trong đó IAA, IBA và NAA đã được sử dụng trong nhân giống lan hài *Paphiopedilum* [6, 13].

3.4.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ tạo cây hoàn chỉnh của lan hài Việt Nam

Bảng 4. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ tạo cây hoàn chỉnh lan hài Việt Nam sau 60 ngày nuôi cấy

Công thức thí nghiệm	Số chồi thí nghiệm (chồi)	Tỷ lệ chồi ra rễ sau 60 ngày nuôi cấy (%)	Số rễ/chồi (rễ)	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái rễ
ĐC (0,0 mg/l)	30	100	1,4	3,74	Trắng, mập, nhiều lông hút
CT2 (0,5 mg/l)	30	100	3,9	4,52	Trắng, mập, nhiều lông hút
CT3 (1,0 mg/l)	30	100	4,2	4,78	Trắng, mập, nhiều lông hút
CT4 (1,5 mg/l)	30	100	4,2	4,30	Vàng, gầy, các lông hút có màu sắc khác thường
CT5 (2,0 mg/l)	30	100	4,7	4,10	Vàng, gầy, các lông hút có màu sắc khác thường
CV%			1,2	0,9	
LSD _{0,05}			0,2	0,3	

Từ kết quả thu được cho thấy việc ra rễ tạo cây hoàn chỉnh loài lan hài Việt Nam không cần thiết sự có mặt của auxin (NAA). Tuy nhiên để tăng số rễ, chiều cao chồi và hình thái chồi cho thấy nồng độ NAA ảnh hưởng rõ rệt tới số rễ/chồi, chiều cao cây và hình thái rễ. Ở nồng độ NAA 1 mg/l bổ sung vào môi trường kích thích ra rễ tạo cây hoàn chỉnh phù hợp nhất với lan hài Việt Nam, cụ thể khi bổ sung 1 mg/l, số rễ/chồi là 4,2, rễ mập, màu trắng sáng, nhiều lông tơ mắt thường quan sát được. Khi nồng độ NAA tăng lên từ 1 - 1,5 mg và 2 mg thì số lượng rễ tăng nhưng chất lượng rễ giảm (rễ vàng, gầy, các lông hút có màu sắc khác thường).

Quá trình kích thích ra rễ trên đối tượng lan hài tùy thuộc vào đặc điểm của giống và nồng độ NAA khác nhau [13]. Nghiên cứu của Hoàng Thị Giang và cs (2010) [6] chỉ ra: nồng độ NAA thích hợp nhất cho giai đoạn ra rễ lan hài Hằng là 0,4 - 0,6 mg/l, số rễ/cây đạt 1,96 - 2,03 rễ. Theo Ngô Thị Nguyệt (2013) [7] sử dụng nồng độ NAA 0,5 mg/l thu được tỷ lệ ra rễ đạt 60%, số rễ trung bình/cây là 2,53 rễ, chiều dài rễ đạt 0,47 cm ở lan hài Vệ nữ. Trong nghiên cứu này cho thấy, nồng độ NAA 0,4 mg/l phù hợp cho quá trình ra rễ trên giống lan hài Giáp

3.4.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của IAA đến khả năng ra rễ tạo cây hoàn chỉnh của lan hài Việt Nam

Bảng 5. Ảnh hưởng của IAA đến khả năng ra rễ tạo cây hoàn chỉnh của lan hài Việt Nam sau 60 ngày nuôi cấy

Công thức thí nghiệm	Số chồi thí nghiệm (chồi)	Tỷ lệ chồi ra rễ sau 60 ngày nuôi cấy (%)	Chiều cao chồi (cm)	Số rễ/chồi (rễ)	Hình thái chồi
ĐC (0,0 mg/l)	30	100	3,74	1,2	Trắng, mập, nhiều lông hút
CT2 (0,5 mg/l)	30	100	4,52	3,6	Trắng, mập, nhiều lông hút
CT3 (1,0 mg/l)	30	100	4,78	3,8	Trắng, mập, nhiều lông hút
CT4 (1,5 mg/l)	30	100	4,30	4,0	Trắng, mập, nhiều lông hút
CT5 (2,0 mg/l)	30	100	4,10	4,3	Vàng, gầy, các lông hút có màu sắc khác thường
CV%			2,9	1,7	
LSD _{0,05}			0,3	0,5	



Hình 3. Ảnh hưởng của hàm lượng IAA và NAA đến khả năng ra rễ lan hài Việt Nam sau 60 ngày nuôi cấy (A. Đối chứng không bổ sung IAA, NAA; B: nồng độ IAA 1 mg/l; C: nồng độ NAA 1 mg/l).

Môi trường bổ sung IAA nồng độ 1,0 - 1,5 mg/l thu được tỷ lệ chồi ra rễ cao hơn so với đối chứng (ra rễ tự nhiên). Nhận thấy rằng CT2 bổ sung IAA 1 mg/l vào môi trường MS cho chiều cao chồi đạt 4,78 cm, số rễ trung bình/chồi đạt 3,8 rễ, chất lượng rễ trắng, mập, nhiều lông hút (Bảng 5). Mặt khác sự gia

tăng nồng độ IAA kèm theo sự giảm sút tỷ lệ chồi ra rễ, số rễ trung bình/chồi và chất lượng rễ. Điều này khẳng định rằng IAA ở nồng độ cao có thể gây ra sự ức chế ra rễ. Do đó sự sinh trưởng của cây giảm thông qua biểu hiện của số rễ/cây, số lá/cây hoặc chiều cao cây [6]. Nhìn chung, sự tích lũy auxin NAA, IAA hoặc IBA ở mô rễ sẽ thúc đẩy sự phát triển của rễ nhưng ở nồng độ thích hợp.

4. KẾT LUẬN

Nuôi cấy nhân giống *in vitro* giống lan hài Việt Nam giai đoạn tái sinh được thực hiện trên nền môi trường MS bổ sung thêm 30 g/l đường, 1 g/l than hoạt tính, 5,5 g/l agar, 150 ml/l nước dừa. Giai đoạn nhân nhanh bổ sung chất điều tiết sinh trưởng BAP 5 mg/l hoặc BA 5 mg/l kết hợp Kinetin 0,6 mg/l. Trong đó, yếu tố kích thích sinh trưởng có ảnh hưởng lớn đến khả năng tạo đa chồi, cho hệ số nhân chồi là 86,2 chồi, chiều cao chồi 2,71 cm, chồi xanh mập.

Rễ lan hài Việt Nam được hình thành và phát triển tốt nhất trong điều kiện môi trường MS bổ sung đường 30 g/l, agar 5,5 g/l, nước dừa 150 ml/l và NAA hoặc IAA nồng độ 1 mg/l, có tác dụng tăng cường sự phát triển của rễ trong điều kiện *in vitro*.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được nhận tài trợ bởi Bộ Khoa học và Công nghệ thông qua Đề tài cấp Nhà nước, mã số: NVQG.ĐT.04. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Averyanov L, Cribb P, Phan KL, Nguyen TH (2004). *Slipper Orchids of Vietnam. Bird Life*, Royal Botanic Gardens KEW; World Bank: Ho Chi Minh City, Vietnam; p. 308.
2. Bộ Khoa học và Công nghệ (2007). *Sách Đỏ Việt Nam, phần II: Thực vật*. Nxb Khoa học Tự nhiên và Công nghệ.
3. Chính phủ (2021). *Nghị định số 84/2021/NĐ-CP ngày 22/9/2021: Sửa đổi, bổ sung một số điều của 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*, Hà Nội.
4. Nhut, D. T., Thuy, D. T. T., Don, N. T., Luan, V. Q., Hai, N. T., Van, K. T. T., Chinnappa, C. C. (2007). *In vitro* stem elongation of *Paphiopedilum delenatii* Guillaumin and shoot regeneration via stem node culture. *Propag. Ornament. Plants*, 7, 29–36.
5. Nguyễn Thị Cúc, Nguyễn Văn Kết, Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Thị Kim Lý (2014). Nghiên cứu ảnh hưởng của một số chất hữu cơ lên quá trình sinh trưởng và phát triển cây lan Hài Hồng (*Paphiopedilum delenatii*) *in vitro*. *Tạp chí Sinh học*, tập 36 (số 1), tr. 250 – 256.
6. Hoàng Thị Giang, Nguyễn Quang Thạch, Mạch Hồng Thẩm, Đỗ Thị Thu Hà (2010). Nghiên cứu nhân giống *in vitro* và nuôi trồng giống lan hài quý *Paphiopedilum hangianum pernergruss* (hài Hằng). *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, tập 8 (số 2), tr. 194 - 201.
7. Ngô Thị Nguyệt (2013). *Thu thập, lưu trữ nguồn gen và ứng dụng công nghệ sinh học trong bảo tồn và phát triển một số loài lan quý ở Quảng Ninh*. Báo cáo tổng hợp kết quả đề tài khoa học công nghệ, Trung tâm Khoa học và Sản xuất Lâm Nông nghiệp Quảng Ninh.
8. Ng, C. Y., Saleh, N. M. (2011). *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchid through formation of protocorm-like bodies. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 105, 193–202.
9. Zeng S., Jia Wang a, b, Kunlin Wu a, Jaime A. Teixeira da Silva c, Jianxia Zhang a, Jun Duan (2013). *In vitro* propagation of *Paphiopedilum hangianum* Perner & Gruss. *Scientia Horticulturae*, 151, 147–156.
10. Chen, T. Y., Chen, J. T., Chang, W. C. (2004). Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *Paphiopedilum* orchids. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 76, 11–15.
11. Huang, L. C., Lin, C. J., Kuo, C. I., Huang, B. L., Murashige, T. (2001). *Paphiopedilum* cloning *in vitro*. *Sci. Hortic*, 91, 111–121.
12. Zeng, S. J., Wu, K. L., Teixeira da Silva, J. A., Zhang, J. X., Chen, Z. L., Xia, N. H., Duan, J. (2012). Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid. *Scientia Horticulturae*, 138, 198–209.
13. Kaur S và Bhutani K. K. (2012). *In vitro* propagation of *Paphiopedilum spicerianum* (Reichb. F.) Pfit. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 7(1), 65–70.

14. Long, B., Niemiera, A. X., Cheng, Z. Y., Long, C. L. (2010). In vitro propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae). *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 101, 151–162.

**RESEARCH FOR MULTIPLE RESPONSIBILITY OF WILD SLIPPER ORCHID
(*Paphiopedilum vietnamense*) BY *IN VITRO* TECHNOLOGY**

**Nguyen Thi Tinh^{1*}, Nguyen Tien Dung², Bui Tri Thuc²,
Duong Thi Thu Hoai², Tran Trung Kien², Ngo Xuan Binh², Tran Ngoc Hung³**

¹*Vietnam Academy of Agricultural Sciences*

²*Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry- Thai Nguyen University*

³*Fruit and Vegetable Research Institute*

Summary

Paphiopedilum vietnamense is one of the endemic species in Vietnam. Selection of fruit after 9 months pollination. Seed germinated on germination MS medium supplemented with 30 g/l sugar, 1 g/l activated charcoal, 5.5 g/l agar, 150 ml/l coconut water. Ability of propagation of *Paphiopedilum vietnamense* from seed embryos showed that regeneration and shoot multiplication on the medium included BA 4 mg/l or BA 4 mg/l combination with Kinetin 0.6 mg/l in MS medium have been sugar 30 g/l, 1 g/l activated carbon, 5.5 g/l agar, 150 ml/l of coconut water, obtained 86.2, average height reached 2.71 cm, good quality. The best growth and rooted plant medium as is MS medium supplemented with 30 g/l sugar, 5.5 g/l agar, 150 ml/l coconut water and 1 mg/l NAA or 1mg/l IAA.

Keywords: *BAP, Slipper Orchid - Paphiopedilum malipoense; NAA, IAA, in vitro culture, bud regeneration.*

Người phản biện: GS.TSKH. Trần Duy Quý

Ngày nhận bài: 29/7/2022

Ngày thông qua phản biện: 29/8/2022

Ngày duyệt đăng: 5/9/2022