

RESEARCH ON USING IN VITRO TECHNIQUES TO PROPAGATE LADY SLIPPER ORCHID (*PAPHIOPEDILUM TRANLIENIANUM*)

Nguyen Thi Tinh^{1,2*}, Nguyen Tien Dung², Bui Tri Thuc², Duong Thi Thu Hoai²
Luu Hong Son², Le Thanh Ninh², Tran Ngoc Hung³, Ngo Xuan Binh²

¹Vietnam Academy of Agricultural Sciences, ²TNU - University of Agriculture and Forestry

³Fruit and Vegetable Research Institute

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 16/8/2022	The difference between lady's slipper orchids and others is easy to realize because of the special morphology of flowers. There is only one sac-like petal, as a slipper in the flower, therefore this orchids species named as "lady's slipper orchids". <i>Paphiopedilum tranlienianum</i> is one of endemic orchids in Vietnam. The fruits, which were pollinated after 9 months, were selected for experiments. The embryos were cultivated and germinated on MS medium, supplemented with 30 g/l sugar, 1 g/l activated carbon, 5.5 g/l agar, 150 ml/l coconut water. The rapid multiplication phase was supplemented with growth regulator as: BAP 4 mg/l or BAP 4 mg/l, combined with 0.4-0.6 mg/l kinetin. In this media, the hormone had a great influence on the ability to create many buds with the coefficient of germination is 79; Shoot height is 2.46 cm; tree is fat and green. The root is induced the most in the MS medium which was supplemented with 30 g/l sugar, 5.5 g/l agar, 150 ml/l coconut water and 1 mg/l concentration of NAA or IAA, which can enhance the growth of root in vitro.
Revised: 15/9/2022	
Published: 15/9/2022	
KEYWORDS	
Slipper Orchid - <i>Paphiopedilum malipoense</i>	
In vitro culture	
Bud regeneration	
NAA	
PLBs	

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG LAN HÀI CHÂN TÍM (*PAPHIOPEDILUM TRANLIENIANUM*) BẰNG KỸ THUẬT IN VITRO

Nguyễn Thị Tinh^{1,2*}, Nguyễn Tiến Dũng², Bùi Tri Thức², Dương Thị Thu Hoài²
Luu Hồng Sơn², Lê Thanh Ninh², Trần Ngọc Hùng³, Ngô Xuân Bình²

¹Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

²Trường Đại học Nông lâm - ĐHTH Thái Nguyên, ³Viện Nghiên cứu Rau Quả

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 16/8/2022	Lan hài rất dễ nhận biết sự khác biệt so với các loài lan khác do hình thái cấu trúc hoa rất đặc biệt. Hoa chỉ có một cánh hoa hình túi nhìn giống như chiếc hài, dựa vào hình thái đặc biệt giống chiếc hài nên loài lan này được đặt tên là lan hài. <i>Lan hài Chân tím</i> (<i>Paphiopedilum tranlienianum</i>) 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 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 4 mg/l kết hợp kinetin 0,6 mg/l. Trong đó, yếu tố hoocmon có ảnh hưởng lớn đến khả năng tạo đa chồi, ở nồng độ Kinetin 0,6 mg/l cho hệ số nhân chồi là 79 chồi, chiều cao chồi 2,46 cm, chồi xanh mập. Rễ được cảm ứng 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 IAA hoặc NAA nồng độ 1 mg/l, có tác dụng tăng cường sự phát triển của rễ trong điều kiện <i>in vitro</i> .
Ngày hoàn thiện: 15/9/2022	
Ngày đăng: 15/9/2022	
TỪ KHÓA	
Hài Chân tím	
In vitro	
Tái sinh chồi	
BAP	
PLB	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6367>

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

1. Đặt vấn đề

Lan hài là một nhóm rất đặc trưng trong họ lan. Lan hài rất dễ nhận biết sự khác biệt so với các loài lan khác do hình thái cấu trúc hoa rất đặc biệt. Hoa chỉ có một cánh hoa hình túi nhìn giống như chiếc hài, dựa vào hình thái đặc biệt giống chiếc hài nên loài lan này được đặt tên là lan hài (Slipper orchid) [1]. Hiện nay, ở Việt Nam đã tìm thấy 22 loài thuộc chi *Paphiopedilum*, trong đó có 8 loài đặc hữu có giá trị chỉ xuất hiện tại Việt Nam như lan hài Hương Lan, hài Hằng, hài Long, hài mạng đỏ tía, hài Táo,... Lan hài Chân tím được tìm thấy ở miền Bắc Việt Nam. Lan hài Chân tím xuất hiện ở các khu rừng nguyên sinh trên núi đá vôi ở độ cao từ 150 đến 300 m. Hài Chân tím là loài lan giá trị thẩm mỹ cao nên rất được thế giới ưa chuộng, do đó tình trạng lan hài bị khai thác nhiều, dẫn đến giảm sút trong tự nhiên. Hiện nay, lan hài Chân tím đã được xếp vào nhóm nguy cấp (EN) trong Sách đỏ Việt Nam và nhóm IA (các loài bị nghiêm cấm khai thác và sử dụng vì mục đích thương mại) [2].

Đặc thù riêng của lan hài là cây sinh trưởng chậm, tỷ lệ nảy mầm của hạt trong tự nhiên thấp [3]. 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 [4]. Lan Hài *Paphiopedilum* được xác định là loại cây khó nhân giống *in vitro*, nhất là trong quá trình tái sinh cây từ mô nuôi cấy [5]. Một vài giống lai *Paphiopedilum* đã được nhân giống thành công từ mô sẹo, chồi và lá [6]. Gần đây, phương pháp nhân giống *in vitro* lan hài rất được quan tâm, trong đó hạt và thể chồi (PLBs) được sử dụng phổ biến để nghiên cứu nhân giống *Paphiopedilum*, mặc dù đã có báo cáo về thành công sử dụng các loại vật liệu khác, bao gồm đỉnh chồi [7], đốt mầm [8]-[10]. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành tái sinh phôi lan hài Chân tím trong môi trường nhân tạo nhằm mục đích tạo nguồn vật liệu cho nhân giống loài hoa đặc hữu có giá trị.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Phôi hạt được tách từ quả thụ phấn sau 9 tháng tuổi thu thập tại khu bảo tồn Thần Sa huyện Võ Nhai, tỉnh Thái Nguyên.

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 phôi khỏi phần vỏ quả. Tiến hành gieo hạt trên nền môi trường dinh dưỡng MS [7], trong thời gian 6 tháng.

Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân nhanh

Hạt lan hài Chân tím tái sinh chồi đạt kích thước 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 kinetine đến khả năng nhân nhanh

Hạt lan hài Chân tím tái sinh chồi đạt kích thước 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 kinetine 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 Chân tím 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/ IBA từ 0; 0,5; 1,0; 1,5 và 2,0 mg/l.

Các bình nuôi cấy phôi và nhân nhanh chồi được nuôi dưỡng trong điều kiện ánh sáng với cường độ 2000 lux và thời gian chiếu sáng 16h sáng/8h 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 và thảo luận

3.1. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của biện pháp khử trùng đến khả năng tạo vật liệu vô trùng của lan hài Chân tím

Để lựa chọn nồng độ và thời gian khử trùng thích hợp cho cây Hải Chân tím chúng tôi đã thử nghiệm khả năng khử trùng với dung dịch HgCl_2 0,1%, NaClO 1%, H_2O_2 0,2% ở các nồng độ và thời gian khác nhau. Sau 7 ngày nuôi cấy kết quả thu được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số dung dịch khử trùng đến hiệu quả tạo vật liệu vô trùng của lan hài Chân tím (sau 7 ngày nuôi cấy)

Công thức	Nồng độ (%)	Thời gian (phút)	Số mẫu đưa vào (mẫu)	Chỉ tiêu đánh giá		
				Tỷ lệ mẫu sống không nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sống nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)
CT1(Đ/c)	Nước cất vô trùng	5	30	0	100	0
CT2	HgCl ₂ 0,1%	0	30	0	100	0
CT3		5	30	64,66	32,33	3,01
CT4		10	30	36,66	60,56	2,78
CT5		0	30	0	100	0
CT6	NaClO 1%	5	30	40	60	0
CT7		10	30	49,33	44,65	6,02
CT8		0	30	0	100	0
CT9	H ₂ O ₂ 0,2%	5	30	63,34	33,33	3,33
CT10		10	30	33,33	0	66,67
		LSD ₀₅		5,1		
	CV (%)		7,6			

Từ kết quả ở bảng 1 cho thấy:

Xét về chỉ tiêu mẫu sống không nhiễm từ CT2 – CT10 cho tỷ lệ mẫu sống cao nhất ở CT3 (64,66%) và thấp nhất ở CT2, CT5, CT8 (0%). Xét về chỉ tiêu tỷ lệ mẫu chết từ CT2 – CT10 cho tỷ lệ mẫu chết cao nhất ở CT10 (66,67%) và thấp nhất ở CT1, CT2, CT5, CT6, CT8 (0,00%). Vì vậy trong thí nghiệm này nên sử dụng HgCl_2 ở nồng độ 0,15% trong 5 phút là thích hợp nhất.

3.2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường đến khả năng tái sinh chồi của lan hài Chân tím sau 4 tháng nuôi cấy

Môi trường khoáng là thành phần quan trọng khởi đầu cho việc phát sinh hình thái của phôi lan hài. Để đánh giá được ảnh hưởng của thành phần khoáng, ảnh hưởng đến khả năng tái sinh của lan hài, chúng tôi đã thực hiện thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường đến khả năng tái sinh chồi từ phôi trên đối tượng lan hài Việt Nam và lan hài Chân tím. Kết quả thu được thể hiện ở bảng 2.

Từ kết quả ở bảng 2 cho thấy môi trường có ảnh hưởng khá rõ rệt đến tỷ lệ nảy mầm của hạt. Kết quả cho thấy môi trường MS tỷ lệ tái sinh chồi (theo bình) và số chồi tái sinh/ bình cao nhất. Tỷ lệ tái sinh đạt 69,7% và số chồi tái sinh/ bình đạt 12,7 chồi/bình, chiều cao chồi đạt 1,86 cm. Ở chỉ tiêu chất lượng chồi cho thấy chất lượng chồi lan hài Chân tím to khỏe có màu xanh đậm, rễ có nhiều lông hút. Vì vậy, chúng tôi đã chọn môi trường nền MS để khảo sát ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường đến khả năng tái sinh chồi của lan hài Việt Nam và lan hài Chân tím sau 4 tháng nuôi cấy

Công thức thí nghiệm	Tỷ lệ tái sinh của mẫu cấy (bình)	Số chồi/ bình (chồi)	Chiều cao chồi (mm)	Chất lượng chồi
MS cơ bản	69,7	12,7	1,86	Xanh, nhiều lông hút
B5 cơ bản	57,2	8,3	1,7	Vàng nhạt
WPM cơ bản	19,4	4,2	1,6	Vàng nhạt
Knudson cơ bản	52,8	4,7	1,9	Vàng nhạt
Phong lan cơ bản	63,5	12,7	1,9	Vàng nhạt
VW	78,2	9,7	2,0	Vàng nhạt
CV%	6,3	1,9	0,4	
LSD.05	6,1	12,2	5,1	



a) Phôi lan hài Chân tím trong môi trường MS sau 4 tháng nuôi cấy



b) Chồi lan hài Chân tím cấy chuyển sang môi trường MS sau khi tái sinh

Hình 1. Hình ảnh phôi lan hài Chân tím tái sinh trong môi trường MS và chồi tái sinh từ phôi

Qua hình 1 cho thấy môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến tỷ lệ tái sinh của mẫu cấy, số chồi/ bình, chiều cao và chất lượng chồi.

3.3. Ảnh hưởng của một số Cytokinin đến khả năng nhân nhanh chồi lan hài Chân tím

3.3.1. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng nhân nhanh chồi lan hài Chân tím

Lan hài là loài sinh trưởng và phát triển chậm, hệ số nhân chồi trong điều kiện *in vitro* rất thấp, vì vậy chúng tôi đã bổ sung 1 số nồng độ BAP để nâng cao hệ số nhân nhanh chồi lan hài Chân tím.

Bảng 3. Kết quả ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng BAP đến khả năng nhân nhanh chồi của mẫu nuôi cấy sau 60 ngày nuôi cấy

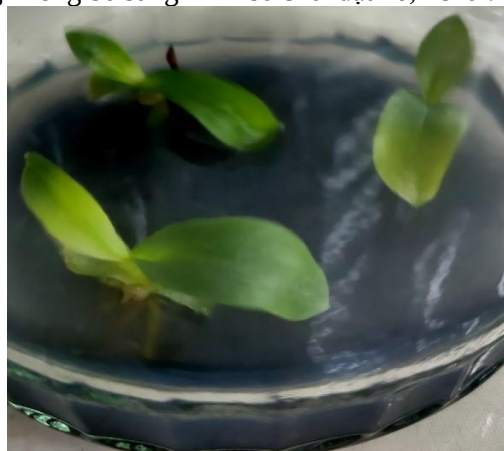
Công thức thí nghiệm	Số chồi thí nghiệm	Số chồi sau 60 ngày nuôi cấy	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái chồi
CT1 (ĐC) 0,0 mg/l	30	40,7	1,5	Gầy, không phát triển
CT2 1,0 mg/l	30	41,3	3,9	Xanh mập
CT3 2,0 mg/l	30	44,2	4,1	Xanh mập
CT4 3,0 mg/l	30	47,8	4,4	Xanh mập
CT5 4,0 mg/l	30	49,1	3,2	Vàng
CT6 5,0 mg/l	30	55,4	1,8	Bạch tạng, phân nhiều chồi, chồi chết
CV%		2,7	0,27	
LSD.05		3,2	3,6	

Số liệu bảng 3 cho thấy nồng độ BAP có ảnh hưởng đến sự phân hoá chồi, sau 60 ngày nuôi cấy thu được ở công thức 6 (5,0 mg/l) là 55,4 chồi, tiếp đó là công thức 5, công thức 4 số chồi thu được

lần lượt là 49,1 và 47,8 chồi, tiếp theo là công thức 3 và công thức 2 số chồi lần lượt thu được là 44,2 và 41,3 chồi. Thấp nhất là công thức đối chứng không bổ sung BAP số chồi đạt 40,7 chồi.



a) *Hài Chân tím trong môi trường MS bổ sung BAP 0 mg/l*



b) *Hài Chân tím trong môi trường MS bổ sung BAP 1 mg/l*



c) *Hài Chân tím trong môi trường MS bổ sung BAP 2 mg/l*



d) *Hài Chân tím trong môi trường MS bổ sung BAP 3 mg/l*



đ) *Hài Chân tím trong môi trường MS bổ sung BAP 4 mg/l*



e) *Hài Chân tím trong môi trường MS bổ sung BAP 5 mg/l*

Hình 2. *Lan hài Chân tím trong môi trường MS bổ sung các nồng độ của BAP*

Kết quả hình 2 cho thấy bổ sung BAP 4mg/l cho chất lượng chồi tốt nhất thể hiện tốt nhất (hình 2đ). 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 4

(3 mg/l), chiều cao chồi đạt 4,4 cm, chồi xanh và mập. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ BAP thì màu sắc chồi đã bị chuyển sang màu vàng, tiếp đó tăng lên 5 mg/l chồi chuyển sang bạch tạng và xuất hiện 1 số chồi bị chết.

Để nhân giống chi lan hài *Paphiopedilum*, nhiều tác giả 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 [11]. 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 [14]. Ở nồng độ BA 1 mg/l đến 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 [12]-[14]. Hệ số nhân chồi và chất lượng chồi thấp thể hiện rõ ở nồng độ BA 5 mg/l [14]. Từ phân tích ở trên, chúng tôi tiến hành lựa chọn nồng độ BAP 3 mg/l bổ sung vào môi trường nhân nhanh lan hài Chân tím.

3.3.2. Ảnh hưởng của BAP (4 mg/l) và một số nồng độ của kinetin đến hệ số nhân nhanh lan hài Chân tím

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 hormone, nồng độ và yếu tố giống [14], [15]. 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 hormone chất kích thích sinh trưởng ngoại sinh hạn chế. Để nâng cao hệ số nhân chồi lan hài Chân tím, chúng tôi đã tiến hành thử nghiệm nồng độ BAP 4 mg/l kết hợp với nồng độ kinetin từ 0 – 1 mg/l. Kết quả thu được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của tổ hợp BAP (4 mg/l) và các nồng độ Kinetin đến khả năng nhân nhanh của mẫu nuôi cấy

Công thức thí nghiệm	Số chồi thí nghiệm	Số chồi sau 60 ngày nuôi cấy	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái chồi
CT1 - ĐC (0,0 mg/l)	30	41	1,97	Xanh mập
CT2 (0,1 mg/l)	30	49	2,05	Xanh mập
CT3 (0,2 mg/l)	30	61	2,31	Xanh mập
CT4 (0,4 mg/l)	30	75	2,40	Xanh mập
CT5 (0,6 mg/l)	30	79	2,46	Xanh mập
CT6 (0,8 mg/l)	30	71	2,37	Vàng
CT7 (1,0 mg/l)	30	68	2,36	Bạch tạng, phân nhiều chồi, chồi chết
LSD.05		2,4	0,4	
CV%		2,2	1,1	



a) Hài Chân tím trong môi trường MS bổ sung BAP 3 mg/l



b) Hài Chân tím trong môi trường MS bổ sung BAP 3 mg/l kết hợp kinetin 0,6 mg/l



c) Hài Chân tím trong môi trường MS bổ sung BAP 3 mg/l kết hợp kinetin 0,8 mg/l



d) Hài Chân tím trong môi trường MS bổ sung BAP 3 mg/l kết hợp kinetin 1,0 mg/l

Hình 3. Lan hài Chân tím trong môi trường MS bổ sung các nồng độ của BAP và các nồng độ kinetine

Hình 3 cho thấy khi môi trường MS bổ sung các nồng độ của BAP và các nồng độ kinetine ở công thức 5 (hình 3b) cho Hài chân tím xanh mập và chất lượng tốt nhất.

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 BAP (3 mg/l) kết hợp Kinetin từ 0,0 - 1,0 mg/l thu được hệ số nhân chồi cao hơn so với đối chứng. Ở nồng độ từ 0,1 đến 0,6 mg/l số chồi thu được lần lượt là 79 chồi ở nồng độ Kinetine 0,6 mg/l; 75 chồi ở nồng độ Kinetine bổ sung 0,4 mg/l, 61 chồi ở nồng độ 0,2 mg/l. Tương tự, chất lượng chồi đạt mức tốt ở CT1 đến công thức CT5. Ở công thức 6 và CT7 chất lượng chồi kém. Điều này cho thấy rằng Kinetine ảnh hưởng đến quá trình nhân chồi, cụ thể ở nồng độ BAP 3 mg/l kết hợp với thay đổi nồng độ Kinetin từ 0 đến 1 mg/l, kèm theo đó tỷ lệ BAP/ Kinetine thay đổi. Trong nghiên cứu này cho thấy BAP 3 mg/l kết hợp Kinetin 0,4 - 0,6 mg/l cho kết quả nhân chồi tốt nhất. Ở chỉ tiêu chất lượng chồi cho thấy hàm lượng BAP 3 mg/l kết hợp với các nồng độ của Kinetin ảnh hưởng nhiều đến chất lượng chồi. Chất lượng chồi tốt nhất nồng độ BAP 3 mg/l kết hợp nồng độ Kinetin 0,6 mg/l. Khi nồng độ Kinetin tăng thì chất lượng chồi giảm dần và dẫn đến 1 số chồi bị chết. Do vậy, giai đoạn nhân nhanh lan hài Chân tím sử dụng nồng độ BAP kết hợp với Kinetin 0,6 mg/l.

3.4. Ảnh hưởng của một số auxin đến khả năng ra rễ tạo cây hoàn chỉnh

Tạo cây hoàn chỉnh thông qua quá trình ra rễ được đáp ứng bởi các hoocmon cảm ứng rễ, trong đó IAA, IBA và NAA đã được sử dụng trong nhân giống lan Hài *Paphiopedilum* [2]. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng các nồng độ của NAA để đánh giá khả năng ra rễ và sinh trưởng của lan hài Chân tím.

Bảng 5. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ tạo cây hoàn chỉnh lan hài Chân tím

Công thức thí nghiệm	Số chồi thí nghiệm	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	1,7	3,4	Trắng, mập, nhiều lông hút
CT2 (0,5 mg/l)	30	100	2,3	3,9	Trắng, mập, nhiều lông hút
CT3 (1,0 mg/l)	30	100	3,7	4,8	Trắng, mập, nhiều lông hút
CT4 (1,5 mg/l)	30	100	3,1	4,4	Vàng, gầy, các lông hút có màu sắc khác thường
CT5 (2,0 mg/l)	30	100	2,8	4,0	Vàng, gầy, các lông hút có màu sắc khác thường
LSD.05			0,8	0,3	
CV%			2,5	4,7	



NAA nồng độ 1 mg/l



NAA nồng độ 1,5 mg/l

Hình 4. Lan hài Chân tím giai đoạn ra rễ

Hình 4 cho thấy NAA ở các nồng độ khác nhau ảnh hưởng tới Lan Hài Chân tím ở giai đoạn ra rễ. Hình 4a là công thức với NAA nồng độ 1mg/l cho rễ trắng, mập, nhiều lông hút.

Từ kết quả thu được cho thấy lan hài Chân tím việc ra rễ tạo cây hoàn chỉnh 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 Chân tím, cụ thể khi bổ sung 1 mg/l số rễ/ chồi là 3,7 rễ, chiều dài rễ 4,8 cm, rễ mập, màu trắng sáng, nhiều lông tơ mắt thường quan sát được. Khi nồng độ NAA tăng lên từ 1 mg đến 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). 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/cây [2]. Trong nghiên cứu này cho thấy nồng độ NAA 1 mg/l phù hợp cho quá trình ra rễ trên giống hài Chân tím.

4. Kết luận

Đã nhân giống thành công lan hài *Phaiolophyllum malipoense*, trong đó giai đoạn tái sinh sử dụng môi trường MS, giai đoạn nhân nhanh bổ sung chất điều tiết sinh trưởng BAP 3 mg/l kết hợp Kinetin 0,6 mg/l, số chồi là 79, chiều cao chồi 2,46 cm, chồi xanh mập. Rễ được cảm ứng tốt nhất trong điều kiện môi trường MS NAA nồng độ 1 mg/l, có tác dụng tăng cường sự phát triển của rễ trong điều kiện *in vitro*.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã tạo điều kiện hỗ trợ kinh phí để nhóm tác giả thực hiện thành công nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] Averyanov, P. Cribb, L. K. Phan, and H. T. Nguyen, *Purple Chan Lanhai*. Ho Chi Minh City Transport Publishing House, 2008.
- [2] G. T. Hoang, T. Q. Nguyen, T. H. Mach, and H. T. T. Do, "Research on in vitro propagation and culture of *Paphiopedilum hangianum pernerguss* (Hai Hang)," *Journal of Science and Development*, vol. 8, no. 2, pp. 194-201, 2010.
- [3] T. H. Khuat *et al.*, "Research on genetic diversity of Vietnamese native *Paphiopedilum concholoro* Pfizer," *Journal of Science and Technology*, no. 3, pp. 70-77, 2007.
- [4] C. Y. Ng and N. M. Saleh, "In vitro propagation of *Paphiopedilum* orchid through formation of protocorm-like bodies," *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, vol. 105, pp. 193-202, 2011.

-
- [5] Y. H. Lin, C. Chang, and W.C. Chang, "Plant regeneration from callus culture of a Paphiopedilum hybrid," *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, vol. 62, pp. 21-25, 2000.
- [6] T. Y. Chen, J. T. Chen, and W. C. Chang, "Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cul tures of Pa phiopediulum orchids," *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, vol. 76, pp. 11-15, 2004.
- [7] L. C. Huang, C. J. Lin, C. I. Kuo, B. L. Huang, and T. Murashige, "Paphiopedilum cloning in vitro," *Sci. Hortic.*, vol. 91, pp. 111-121, 2001.
- [8] D. T. Nhut, D. T. T. Thuy, N. T. Don, V. Q. Luan, N. T. Hai, and K. T. T. Van, "In vitro stem elongation of *Paphiopedilum delenatii* Guillaumin and shoot regeneration via stem node culture," *Propag. Ornam. Plants*, vol. 7, pp. 29-36, 2007.
- [9] B. Long, A. X. Niemiera, Z. Y. Cheng, and C. L. Long, "In vitro propagation of four threatened Paphiopedilum species (Orchidaceae)," *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, vol. 101, pp. 151-162, 2010.
- [10] T. Q. Nguyen, H. T. Vu, N. T. H. Khuat, and T. T. Nguyen, "In vitro propagation of Phi Diep Tim orchid (*Dendrobium anosmum*)," *Journal of Forestry Science and Technology*, no. 3, pp. 16-21, 2013.
- [11] C. T. Nguyen, K. V. Nguyen, T. N. Duong, and T. K. L. Nguyen, "Study on the effects of some organic substances on the growth and development of Hai Hong orchid (*Paphiopedilum delenatii*) in vitro," *Journal of Biology*, vol. 36, no. 1, pp. 250-256, 2014.
- [12] S. Zeng, J. Wang, K. Wu, A. Jaime, T. da Silva, J. Zhang, and J. Duan, "In vitro propagation of *Paphiopedilum hangianum* Perner & Gruss," *Scientia Horticulturae*, vol. 151, pp. 147-156, 2013.
- [13] S. Kaur and K. K. Bhutani, "In vitro propagation of *Paphiopedilum spicerianum* (Reichb. F.) Pfit," *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, vol. 7, no. 1, pp. 65-70, 2012.
- [14] S. J. Zeng, Z. L. Chen, K. L. Wu, J. X. Zhang, C. K. Bai, J. A. Teixeira da Silva, and J. Duan, "Asymbiotic seed germination, induction of calli and protocorm-like bodies, and in vitro seedling development of the rare and endangered *Nothodoritis zhejiangensis* Chinese orchid," *HortScience*, vol. 46, no. 3, pp. 460-465, 2011.
- [15] S. J. Zeng, K. L. Wu, J. A. Teixeira da Silva, J. X. Zhang, Z. L. Chen, N. H. Xia, and J. Duan, "Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid," *Scientia Horticulturae*, vol. 138, pp. 198-209, 2012.