

TÁI SINH LAN HÀI ĐỎM *PAPHIOPEDILUM CONCOLOR* TỪ CHỒI NON VÀ HẠT

Vũ Thị Lan^{1*}, Trần Thị Thu Trang²

¹Trường Đại học Khoa học - ĐH Thái Nguyên

²Trường THCS Thạch Thát, Hà Nội

TÓM TẮT

Lan Hải Đốm là một trong các loài đặc hữu của Việt Nam. Hoa lan Hải Đốm lớn màu vàng nhạt với nhiều đốm nhỏ màu tím, có giá trị thẩm mỹ và có giá trị dược học. Một số nhà khoa học đã báo cáo kết quả nghiên cứu về sự đa dạng, sự tái sinh hoặc nhân giống cây Lan Hải Đốm từ chồi ngủ, thân mầm. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm khảo sát khả năng tái sinh cây Lan Hải Đốm thu thập ở Thái Nguyên từ chồi non và hạt sau thụ phấn khoảng 170-200 ngày. Các kết quả thu được là: Chồi non được khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong 15 phút cho tỷ lệ mẫu sạch đạt 50% sau 2 tuần. Các chồi *in vitro* thu được sinh trưởng và phát triển tốt, số lá/chồi đạt 3,8 và độ rộng lá đạt 0,70 cm sau 4 tháng nuôi cấy. Quả lan Hải có độ tuổi phù hợp là khoảng 170 ngày và được khử trùng bằng dung dịch HgCl_2 0,1% trong 15 phút cho tỷ lệ mẫu sạch thu được từ 75% đến 100%. Hạt nảy mầm trên môi trường MS bổ sung BAP 2mg/l (tỷ lệ bình nảy mầm đạt 81,7%). Thời gian nảy mầm của hạt là 90 ngày đến 100 ngày. Chồi hình thành 1 đến 2 lá sau 90 ngày nuôi cấy. Các cây Lan Hải Đốm *in vitro* hoàn chỉnh và khỏe mạnh đã thu được sau 110 - 120 ngày nuôi cấy với 2-3 lá, 1-2 rễ nhỏ và ngắn. Các kết quả của nghiên cứu này đã tạo ra nguồn nguyên liệu ban đầu để nghiên cứu hoàn thiện quy trình nhân giống lan Hải Đốm.

Từ khóa: Lan Hải Đốm, nảy mầm, môi trường, hạt, tái sinh

Ngày nhận bài: 05/8/2019; **Ngày hoàn thiện:** 25/9/2019; **Ngày đăng:** 04/10/2019

REGENERATION OF *PAPHIOPEDILUM CONCOLOR* FROM YOUNG BUDS AND SEEDS

Vu Thi Lan^{*}, Tran Thi Thu Trang

¹University of Science – TNU, ²Thach That Secondary School, Ha Noi

ABSTRACT

Paphiopedillum concolor is one of the endemic species of Vietnam. It is a small slipper orchid with relatively large pale yellowish fragrant flowers finely spotted with purple. It has both aesthetic and medicinal value. Some of scientists has been reported the result of research on the diversity, regeneration or propagation of *Paphiopedillum concolor* from auxiliary buds. This research was conducted to investigate *in vitro* propagation of *Paphiopedillum concolor* collected in Thainguyen, Vietnam. Materials for *in vitro* propagation include of young buds and seeds collected from fruits aged about 170-200 days after pollination (DAP). In conclusion, young buds sterilized by 0.1% HgCl_2 for 15 minutes for a 50% clean sample rate after two weeks. *In vitro* shoots grew and developed well, leaf number per shoot reached 3.8 and leaf width reached 0.70 cm after four months. *P. concolor* fruits aged about 170 days after pollination (DAP) sterilized by 0.1% HgCl_2 solution for 15 minutes for a clean sample rate of 87,5%. Seeds germinated on MS medium supplemented with BAP 2mg/l (Seed germination rate reached 81,7%). Seed germination time was 90 days to 100 days. Shoots formed 1 to 2 leaves after 90 days of culture. *In vitro* *P. concolor* plantlets have been created with 2- 3 leaves, 1-2 small and short roots after 110-120 days cultivation. This reseach has created materials to complete the protocol of propagation of *Paphiopedillum concolor*.

Keywords: *Paphiopedillum concolor*, germination, medium, regeneration, seed

Received: 05/8/2019; **Revised:** 25/9/2019; **Published:** 04/10/2019

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

1. Đặt vấn đề

Việt Nam là một trung tâm lan Hải lớn của thế giới, với 22 loài thuộc chi *Paphiopedilum*, trong số đó có nhiều loài là đặc hữu có giá trị chỉ xuất hiện tại Việt Nam như lan Hải Bóng, Hải Đỏ, lan Hải Vàng, lan Hải Tía, lan Hải Trắng, lan Hải Vân, lan Hải Đốm, lan Hải Long hay lan Hải Râu,...[1]. Tuy nhiên, tất cả các loài thuộc chi *Paphiopedilum* đang biến mất một cách nhanh chóng. Những nghiên cứu thực địa và điều tra thực tế của Averyanov và đồng tác giả (2004) cho thấy mức độ đe dọa tuyệt chủng của các loài lan Hải là rất nguy cấp, cần ưu tiên bảo tồn ở Việt Nam [1].

Nguyên nhân làm suy giảm nhanh chóng số lượng các loài lan Hải ở Việt Nam là do hai yếu tố: Thứ nhất là sự thay đổi môi trường sống do con người gây nên với việc khai thác gỗ, chặt phá rừng không theo kế hoạch cùng với nạn đốt rừng làm nương rẫy đã làm mất đi nơi sinh sống của các loài lan Hải; Yếu tố thứ hai là việc thu hái lan Hải trên quy mô lớn của những người dân địa phương để bán cho người buôn Lan.

Việc bảo tồn các loài lan Hải đang thu hút sự quan tâm rất lớn của các nhà khoa học. Những nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào để nhân nhanh các loài lan Hải đặc hữu ở Việt Nam còn ít và kết quả thu được còn rất hạn chế do gặp nhiều khó khăn trong khâu vào mẫu và mới chỉ thành công ban đầu ở một vài giống như Hải hăng [2], Hải hồng [3], Hải Bóng [4].

Lan Hải Đốm có tên khoa học *Paphiopedilum concolor* là loài mọc trong các hốc trên núi đá vôi ở các vùng núi đá vôi thấp của miền Bắc Việt Nam như Quảng Ninh, Hải Phòng, Hà Nội, Bắc Kạn, Thái Nguyên, Vĩnh Phúc, Bắc Giang, Lạng Sơn, Hà Nam, Nam Định [1]. Hoa màu vàng tươi có đốm nhỏ màu đỏ. Kích thước hoa khá khiêm tốn, nhưng chúng thường nở thành từng chùm từ 1-3 chiếc rất đẹp, hương thơm nhẹ nhàng. Đã có một số

nghiên cứu về đối tượng lan Hải *P. concolor* của Việt Nam được công bố. Nghiên cứu đa dạng di truyền của Khuất Hữu Trung và cộng sự cho thấy loài Lan Hải Đốm bản địa của Việt Nam rất đa dạng và phong phú [5]. Nguyễn Thị Tình và cộng sự (2017) đã báo cáo nhân giống cây lan Hải Gấm/Hải Đốm từ mầm ngủ thân mầm. Tác giả thu được cây tái sinh và đã nghiên cứu giai đoạn nhân nhanh, ra rễ và đưa cây ra vườn ươm [6]. Tuy nhiên, cây Lan Hải Đốm gần như không có thân (thân rất ngắn) nên vật liệu thân mầm rất hạn chế. Hiện nay, chưa có công bố nào ở Việt Nam về nghiên cứu nhân giống Lan Hải Đốm *P. concolor* bằng các nguyên liệu chồi ngọn *ex vitro* hay gieo hạt *in vitro*. Bài báo này trình bày một số kết quả nghiên cứu về tái sinh Lan Hải Đốm từ các nguyên liệu chồi non và hạt từ quả được thụ phấn tại phòng thí nghiệm của chúng tôi.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu:

Vật liệu cho nhân giống *in vitro* gồm hai loại là: (1) Chồi non khoảng 2 tháng tuổi được tái sinh từ rễ cây Hải Đốm; (2) Quả Lan Hải Đốm được thu thập từ các cây Lan Hải Đốm nuôi trồng tại vườn bảo tồn lan Hải của trường Đại học Khoa học Thái Nguyên.

2.2. Phương pháp khử trùng chồi *ex vitro*

Mẫu là các chồi non thu về rửa sạch đất cát dưới vòi nước chảy, sau đó rửa bằng xà phòng loãng, tiếp theo rửa sạch xà phòng, mang vào box cấy để khử trùng. Mẫu được ngâm trong dung dịch cồn 70% trong 30 giây, tráng lại bằng nước cất khử trùng 3 lần, tiếp theo được khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% trong các khoảng thời gian 10 phút, 12 phút và 15 phút có bổ sung vài giọt Tween 20, sau mỗi lần khử trùng rửa lại mẫu bằng nước cất khử trùng nhiều lần. Sau khi khử trùng, mẫu được cấy lên môi trường đã chuẩn bị là môi trường MS (đối chứng) và môi trường MS bổ sung BAP 2 mg/l để theo dõi và đánh giá hiệu quả khử trùng và khả năng sống sót cũng như đặc điểm sinh trưởng và phát triển của mẫu.

2.3. Phương pháp khử trùng quả Lan Hải Đóm

Quả Lan Hải Đóm sau khi thụ phấn tại vườn bảo tồn được theo dõi sự sinh trưởng và phát triển của quả. Quả sẽ được thu hái từ 170 ngày đến 200 ngày sau thụ phấn (days after pollination, viết tắt là DAP). Quả cắt về rửa sạch dưới vòi nước chảy, ngâm trong xà phòng loãng khoảng 5 phút, tiếp theo rửa sạch xà phòng và tráng mẫu bằng nước cất, mang vào box cấy để khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong 15 phút (chế độ 1) hoặc khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong 15 phút, sau đó nhúng cón và đốt (chế độ 2). Sau mỗi lần khử trùng bằng HgCl_2 rửa lại mẫu bằng nước cất khử trùng nhiều lần.

Quả sau khi khử trùng dùng dao bóc dọc quả, tách lấy hạt và nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung BAP 2mg/l hoặc MS bổ sung BAP 2 mg/l, nước dừa 100ml/l. Lượng hạt gieo trên các bình nuôi cấy là tương đương nhau. Theo dõi hiệu quả khử trùng quả và khả năng nảy mầm của hạt.

2.4. Ảnh hưởng của tuổi quả và môi trường đến khả năng nảy mầm của hạt

Quả Lan Hải Đóm sau thụ phấn được ghi lại ngày tháng và tính tuổi để thu quả đem nuôi cấy. Quả được thu có độ tuổi 170 DAP và 200 DAP, tiến hành khử trùng bằng dung dịch HgCl_2 0,1% trong 15 phút và tách lấy hạt nuôi cấy trên hai môi trường là MS bổ sung BAP 2 mg/l và MS bổ sung BAP 2 mg/l và nước dừa 100ml/l. Lượng hạt gieo trên các bình nuôi cấy là tương đương nhau. Theo dõi khả năng nảy mầm của hạt.

2.5. Theo dõi thời gian các giai đoạn trong phát sinh hình thái trong gieo hạt in vitro

Hạt được nuôi cấy trên môi trường thích hợp và theo dõi sự phát sinh hình thái các giai đoạn trong quá trình nảy mầm hạt đến tạo chồi in vitro hoàn chỉnh. Ghi lại thời gian của các giai đoạn (ngày) theo dõi được.

2.6. Phương pháp xử lý số liệu: Các số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học trên máy tính bằng phần mềm Microsoft

Excel. 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 biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo phép kiểm định Duncan với $p < 0,05$.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Nghiên cứu khử trùng mẫu đối với chồi non và quả

Các loài thuộc chi *Paphiopedilum* được coi là khó tái sinh từ nuôi cấy mô do nguồn nguyên liệu hiếm, khó khăn trong khâu vào mẫu do nhiễm bẩn vi khuẩn và nhiễm nấm của các mẫu có nguồn gốc từ *ex vitro* và sự phát triển kém của cây dưới điều kiện *in vitro*. Các quy trình khử trùng mẫu có thể ảnh hưởng đến hiệu quả của bước vô trùng và chất lượng mẫu tiếp theo cũng như ảnh hưởng đến sự phát sinh cơ quan của mẫu mô sau đó [7]. Trong nghiên cứu này, chồi non *ex vitro* được khử trùng bằng dung dịch HgCl_2 0,1% trong ba khoảng thời gian là 10 phút, 12 phút và 15 phút (Bảng 1). Quả lan Hải Đóm được khử trùng theo hai chế độ: chế độ 1 và chế độ 2 (Bảng 2).

3.1.1. Hiệu quả khử trùng mẫu đối với chồi non

Kết quả thu được ở bảng 1 cho thấy có sự khác biệt về hiệu quả khử trùng của các chế độ khử trùng nghiên cứu. Trong đó, khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong 15 phút thu được hiệu quả khử trùng cao nhất, tỷ lệ mẫu sạch sống sau 2 tuần là 50%, tỷ lệ mẫu nhiễm thấp nhất (20%). Khi khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong 10 phút thì tỷ lệ mẫu nhiễm rất cao (80%), các mẫu còn lại bị chết (20%), không thu được mẫu sạch. Khi khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong 12 phút thì tỷ lệ mẫu nhiễm vẫn cao (50%), tỷ lệ chết chiếm 30%, tỷ lệ mẫu sạch sống là 20%. Trong ba chế độ khử trùng, đều có tỷ lệ chết từ 20 - 30%, điều này có thể một phần là do hóa chất gây độc mẫu và làm tổn thương các mô còn non.

Cho đến nay, chỉ có ba báo cáo về quá trình vi nhân giống *Paphiopedilum* từ các mẫu mô *ex vitro* [7]: Stewart & Button (1975) đã sử dụng

các mẫu hoa non và trưởng thành, đầu lá, rễ, nhị hoa, bầu nhụy và chồi đỉnh của ba loài thuộc chi *Paphiopedilum* trồng ngoài tự nhiên (*P. villosum*, *P. fairrieianum*, *P. insigne*). Huang (1988) đã khử trùng đỉnh chồi của giống lai *Paphiopedilum* bằng dung dịch NaClO 0,5% trong 15 phút dưới áp suất chân không nhẹ, sau đó các đỉnh chồi khoảng 2-3 mm đã được cắt bỏ dưới kính hiển vi để giảm sự nhiễm trùng. Ngoài ra, môi trường MS có chứa kháng sinh là carbenicillin hoặc cefotaxime với nồng độ 100-500 mg/l có hiệu quả hạn chế sự nhiễm vi khuẩn ở các môi trường nuôi cấy ban đầu. Liao et al. (2011) báo cáo rằng những lát cắt ngang của các giống *Paphiopedilum* lai như *P. Deperle* và *P. Armeni* White có thể tạo các chồi bất định và tái sinh.

3.1.2. Hiệu quả của chế độ khử trùng đối với quả lan Hải Đóm

Kết quả thu được theo dõi hiệu quả khử trùng và khả năng nảy mầm của hạt sau khử trùng sau 2 tháng cho thấy hai chế độ khử trùng nghiên cứu đã cho hiệu quả khác nhau rõ rệt và khác biệt so với đối chứng (Bảng

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng $HgCl_2$ đối với chồi Lan Hải Đóm sau 2 tuần

Thời gian khử trùng $HgCl_2$ 0,1% (phút)	Số mẫu	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)
10	20	20	80	0
12	20	30	50	20
15	20	30	20	50

Bảng 2. Hiệu quả khử trùng đối với quả Lan Hải Đóm

Chế độ	Khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% (phút)	Khử trùng bằng đốt cồn	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Khả năng nảy mầm
Đối chứng	0	Không	0	100	Không
Chế độ 1	15	Không	100	0	Có
		Không	75	25	Có
Chế độ 2	15	Có	100	0	Không
		Có	100	0	Không

3.2. Đặc điểm sinh trưởng của chồi non nuôi cấy *in vitro*

Các chồi non Lan Hải Đóm sau khi khử trùng được cấy lên môi trường MS (đối chứng, không bổ sung BAP) và môi trường thí nghiệm (MS bổ sung BAP 2 mg/l, than hoạt tính 0,5 g/l) để theo dõi đặc điểm sinh trưởng và phát triển của cây lan Hải trong điều kiện *in vitro* (Bảng 3).

Kết quả thu được ở bảng 3 cho thấy cây Lan Hải Đóm sau khi khử trùng đã sống sót và tiếp tục sinh trưởng và phát triển trên hai môi trường nghiên cứu. Trên môi trường thí nghiệm

(TN), các cây Lan Hải Đóm sinh trưởng và phát triển khá, các chỉ tiêu sinh trưởng đều đạt cao hơn so với các cây trên môi trường ĐC. Đa số các cây đã ra lá mới, số lá/chồi đạt 3,0 và 3,8 sau 2 tháng và 4 tháng nuôi, có sự tăng trưởng về độ lớn của lá so với ban đầu và so với các cây trên môi trường đối chứng, đạt 0,55 cm và 0,7cm sau 2 và 4 tháng (Bảng 3, Hình 1). Tuy nhiên, tất cả các cây đều không phát sinh rễ và chồi mới. Có thể do môi trường nuôi cấy chưa phù hợp hoặc khả năng tái sinh rễ và tạo đa chồi ở lan Hải là tương đối khó trong nuôi cấy *in vitro*. Điều này chính là trở ngại lớn trong nhân giống *in vitro* lan Hải.

Dương Tấn Nhựt và cộng sự (2005) thấy rằng không có chồi *P. delenatii* nào được hình thành khi nuôi cấy các chồi không bị thương tổn trong ống nghiệm trong tất cả các loại môi trường thử nghiệm. Khi tạo tổn thương bằng cách tạo vết cắt trên chồi thì trung bình có 2,3 chồi khỏe mạnh thu thập được từ những cây con nuôi cấy trên môi

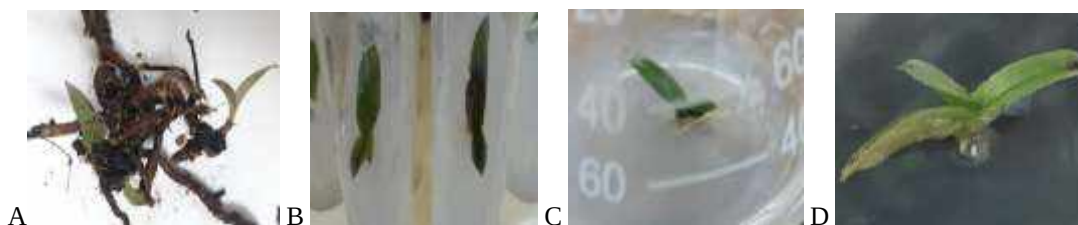
trường MS rắn có chứa TDZ 0,25 mg/l và NAA 0,5 mg/l. Các tế bào bị thương ở khu vực bị hư hỏng có thể đã phản ứng dễ dàng hơn với các tác nhân kích thích là TDZ và trạng thái môi trường lỏng cho phép biệt hóa thành những chồi bất định [3]. Do đó, cần có thêm các nghiên cứu về khả năng tạo rễ và tái sinh chồi của các cây Lan Hải Đóm trong thời gian tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của tuổi quả và môi trường đến khả năng nảy mầm của hạt

Sự nảy mầm và phát triển của hạt các loài lan Hải thuộc chi *Paphiopedilum* chịu ảnh hưởng đáng kể bởi một số yếu tố, bao gồm sự trưởng thành của hạt, tiền xử lý hạt, thành phần môi trường nuôi cấy, điều kiện nuôi cấy và phương pháp nuôi cấy [7], [10]. Trong nghiên cứu này, quả Lan Hải Đóm từ 170 đến 200 ngày sau thụ phấn được thu về và tiến hành khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong 15 phút và nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung BAP 2 mg/L hoặc MS bổ sung BAP 2 mg/L, nước dừa 100ml/l.

Bảng 3. Đặc điểm sinh trưởng của cây Lan Hải Đóm *in vitro* sau 4 tháng

Môi trường	Nồng độ BAP (mg/l)	Chỉ tiêu sinh trưởng			
		Số lá/chồi	Độ rộng lá (cm)	Số chồi/mẫu	Chất lượng chồi
Ban đầu					
ĐC	0	2,0	0,4 ± 0,18	1,0	Vàng nhạt, nhỏ
TN	2	2,0	0,39 ± 0,28	1,0	Vàng nhạt, nhỏ
Sau 2 tháng nuôi cấy					
ĐC	0	2,2 ^a ± 0,4	0,45 ^a ± 0,10	1,0	Xanh nhạt, nhỏ
TN	2	3,0 ^b ± 0,63	0,55 ^{ab} ± 0,25	1,0	Xanh nhạt, mập
Sau 4 tháng nuôi cấy					
ĐC	0	2,6 ^a ± 0,49	0,52 ^a ± 0,28	1,0	Xanh nhạt, nhỏ
TN	2	3,8 ^b ± 0,74	0,70 ^b ± 0,15	1,0	Xanh nhạt, mập



Hình 1. Tái sinh Lan Hải Đóm từ chồi *ex vitro*.

A) Chồi non *ex vitro*; B) Mẫu mới khử trùng; C) Mẫu trên môi trường ĐC sau 4 tháng; D) Mẫu trên môi trường BAP 2mg/l sau 4 tháng

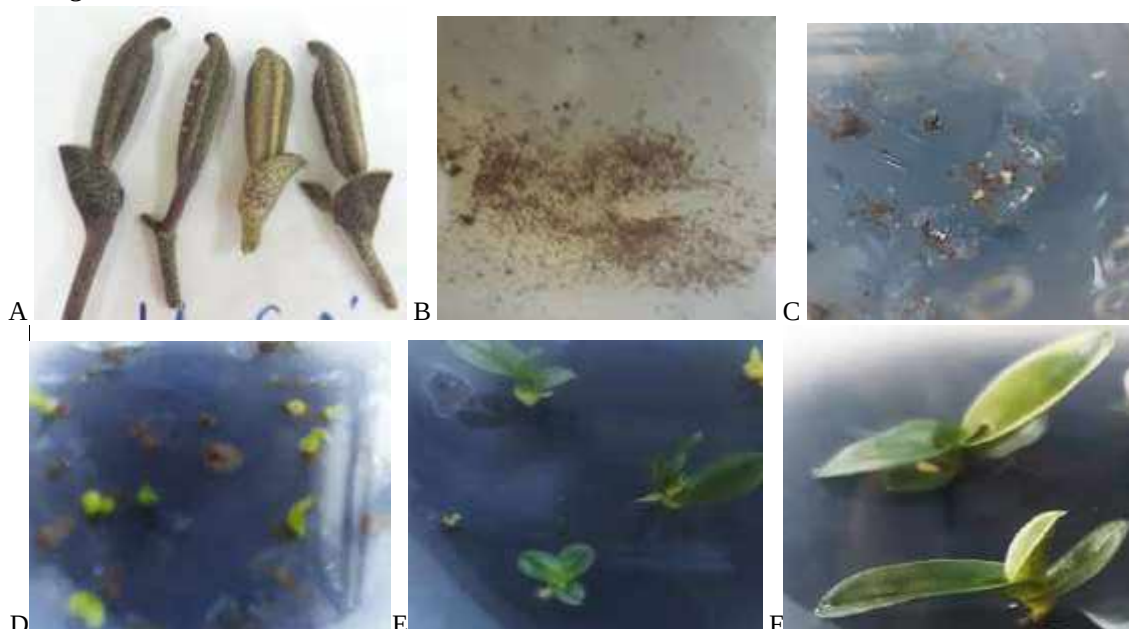
Kết quả đã cho thấy chỉ có các bình chứa hạt Lan Hải Đóm 170 ngày tuổi sau thụ phấn nảy mầm, còn các hạt thu từ quả 200 DAP không nảy mầm. Thời gian nảy mầm của hạt khá lâu, phải khoảng 90-100 ngày. Mặt khác, chỉ thu được hạt nảy mầm trên môi trường MS bổ sung BAP 2 mg/l với tỷ lệ hạt nảy mầm 81,7% ($81,7^a \pm 2,33$). Còn trên môi trường MS bổ sung BAP 2 mg/l và nước dừa 100 ml/l chưa thu được hạt nảy mầm. Có thể do chất lượng của hạt từ các quả thu được không tốt nên chưa đánh giá được hàm lượng nước dừa này có phù hợp cho hạt nảy mầm hay không. Điều này cho thấy khả năng nảy mầm của hạt lan Hải ngoài phụ thuộc vào yếu tố chế độ khử trùng, tuổi quả, môi trường nuôi cấy còn phụ thuộc vào chất lượng của từng quả cụ thể ở cùng độ tuổi. Vì vậy, cần có nhiều nghiên cứu sâu hơn để xem xét ảnh hưởng của từng yếu tố này.

Theo Giang và cộng sự (2010), quả lan Hải Hằng có tuổi từ 6-10 tháng có khả năng nảy mầm với tỷ lệ 58-67%. Theo Zeng và cs (2013) nghiên cứu khả năng nảy mầm của quả Hải Hằng có độ tuổi từ 5-7 tháng cho rằng hạt đạt 180 ngày sau thụ phấn (DAP) phù hợp cho nuôi cấy. Tỷ lệ hạt nảy mầm (72.67%) trên môi trường có chứa NAA 0.5 mg/l, nước dừa 10%, than hoạt tính

1,0 g/l [2]. Ngoài ra, tỷ lệ hạt nảy mầm của cùng một loài trên cùng một môi trường cũng không nhất quán, ví dụ tỷ lệ nảy mầm của hạt *P. armeniacum* 120 ngày sau khi thụ phấn là 25.2% [8] và 18.4% [9] trên môi trường Robert Ernst.

3.4. Theo dõi thời gian các giai đoạn trong phát sinh hình thái trong gieo hạt *in vitro*

Khi hạt Lan Hải Đóm nảy mầm có màu trắng, sau khoảng 20 ngày hạt trương to dần lên và chuyển sang màu xanh. Sau 40 ngày tạo cụm protocorm màu xanh, mỗi cụm chỉ có 2-3 thể chồi. Số hạt nảy mầm trong mỗi bình khá ít chỉ khoảng 10-20 hạt trên bình, còn lại không nảy mầm. Ngoài ra, các bình mẫu sạch thu được nhưng sau khi nuôi cấy đã không có hạt nảy mầm, điều này có thể là do các hạt còn lại chất lượng hạt không tốt hoặc bị lép và không có khả năng nảy mầm. Sau đó, các thể chồi tiếp tục sinh trưởng và phát triển nhưng rất chậm, sau 90 ngày mới tạo các chồi có 1-2 lá màu xanh nhưng chưa có rễ. Sau nảy mầm khoảng 110 đến 120 ngày, các cây Lan Hải Đóm *in vitro* hoàn chỉnh được tạo thành với 2-3 lá xanh đậm và 1-2 rễ nhỏ và ngắn (Hình 2).



Hình 2. Hình ảnh tái sinh Lan Hải Đóm từ hạt.

A) Quả Lan Hải Đóm, B) Hạt Lan Hải Đóm gieo trên môi trường, C) Hạt bắt đầu nảy mầm, D) Protocorm hình thành, E) Chồi với 2-3 lá thật sau 100 ngày, F) Cây Lan Hải Đóm hoàn chỉnh sau khi nảy mầm 150 ngày

Theo Zeng và cs (2012), sự nảy mầm, tăng trưởng của cây con và sự phát triển trong ống nghiệm của chi *Paphiopedilum* thường được chia thành 5 giai đoạn: (1) quá trình nảy mầm: quá trình tách vỏ hạt giống bằng cách phình to của phôi; (2) sự xuất hiện của chồi (mô phân sinh non) và/hoặc rễ giả; (3) sự xuất hiện và sự kéo dài của lá thứ nhất; (4) sự hiện diện của một lá và một hoặc nhiều rễ; (5) sự hiện diện của hai hoặc nhiều lá và rễ, hình thành cây con [10].

Như vậy, đây là công trình đầu tiên ở Việt Nam công bố về tái sinh *in vitro* cây Lan Hải Đóm từ nguyên liệu hạt (giao hạt *in vitro*) và đã theo dõi thời gian của các bước biệt hóa từ hạt lan đến tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh.

4. Kết luận

Cây Lan Hải Đóm đã được tái sinh thành công từ chồi non và hạt sau thụ phấn 170 ngày. Chồi non sau khi khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 15 phút thu được 50% mẫu chồi sạch được tái sinh. Các chồi *in vitro* này sinh trưởng và phát triển tốt, số lá/chồi đạt 3,8 và độ rộng lá đạt 0,70 cm sau 4 tháng nuôi cấy. Hạt từ quả Lan Hải Đóm có độ tuổi khoảng 170 DAP sau khi khử trùng bằng dung dịch $HgCl_2$ 0,1% trong 15 phút cho tỷ lệ mẫu sạch thu được đạt 87,5% và các hạt có khả năng nảy mầm trên môi trường MS bổ sung BAP 2 mg/l. Các cây Lan Hải Đóm *in vitro* hoàn chỉnh đã thu được sau 110-120 ngày. Các kết quả này là tiền đề cho các nghiên cứu nhân giống Lan Hải nói chung và Lan Hải Đóm nói riêng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Leonid Averyanov, Phillip Cribb, Phan Kế Lộc, Nguyễn Tiến Hiệp, Lan Hải Việt Nam, Nxb Giao thông vận tải, Hà Nội, 2004.
- [2]. Hoàng Thị Giang, Nguyễn Quang Thạch, Mạch Hồng Thắm, Đỗ Thị Thu Hà, “Nghiên cứu nhân giống *in vitro* và nuôi trồng lan Hải quý *P. hangianum* perner Gurss (Hải Hạng) thu thập ở Việt Nam”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, T. 8, S. 2, tr. 194 – 201, 2010.
- [3]. Dương Tấn Nhựt, “Một số kỹ thuật mới trong nhân giống vô tính cây lan Hải”. Báo cáo khoa học Hội thảo ứng dụng các kỹ thuật mới trong nhân giống và nuôi trồng hoa Lan tại thành phố Hồ Chí Minh, tr.13- 18, 2005.
- [4]. Thi Tinh Nguyen, Tien Dung Nguyen, Xuan Thanh Dao, Truc Dat Chu, Xuan Binh 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. ISSN: 0000-000X.
- [5]. Khuất Hữu Trung, “Nghiên cứu đa dạng di truyền loài Lan Hải Đóm (*Paphiopedilum concolor* Pfitzer) bản địa của Việt Nam”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, T.3, S. 12, tr. 70-77, 2009.
- [6]. Nguyễn Thị Tinh, Nguyễn Tiến Dũng, Phạm Thị Nam, Chu Thúc Đạt, Ngô Xuân Bình, “Nghiên cứu nhân giống *in vitro* Lan Hải Đóm”, *Tạp chí Nông Nghiệp và Phát Triển Nông Thôn*, T.2, S.12, tr. 79-83, 2017.
- [7]. Zeng S, Huang W, Wu K, Zhang J, da Silva JA, Duan J, “*In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchids”, *Crit Rev Biotechnol*, Vol. 36, No.3, pp. 521-534, 2016.
- [8]. Chen TY, Chen JT, Chang WC., “Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *Paphiopedilum* orchids”, *Plant Cell Tissue Organ Cult*, Vol.76, pp.11–15, 2004.
- [9]. Ding CC, Wu H, Liu FY. “Factors affecting the germination of *Paphiopedilum armeniacum*”, *Acta Bot Yunnanica*, Vol.26, pp.673–637, 2004.
- [10]. Zeng SJ, Wu KL, Teixeira da Silva JA. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid. *Sci Hortic*, Vol.138, 198-209, 2012.

