

NHAN NHANH GIỐNG LAN HẢI TAM ĐẢO (*PAPHIOPEDILUM GRAXTRIXIANUM*) THÔNG QUA PHÁT SINH PROTOCORM-LIKE BODY

Vũ Quốc Luận¹, Nguyễn Phúc Huy¹, Đỗ Khắc Thịnh², Dương Tấn Nhựt¹

¹Viện Nghiên cứu khoa học Tục Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Khoa học kỹ thuật nông nghiệp miền Nam, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng các môi trường khoáng khác nhau để khảo sát sự nảy mầm của hạt Lan hải Tam Đảo (*Paphiopedilum graxtrixianum*). Kết quả tỉ lệ hạt giống nảy mầm cao nhất (77,50%) trên môi trường SH có bổ sung 0,5 mg/l NAA, 0,1 mg/l BA, 9 g/l agar, 20 g/l sucrose và 1 g/l than hoạt tính. Các protocorm-like body (PLB) có nguồn gốc từ hạt được cảm ứng tạo PLB mới (3,5 PLB/mẫu) thu được trên môi trường có bổ 1 mg/l 2,4-D, 20 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính và số PLB nhân nhanh cao nhất (11,0 PLB/mẫu) thu được trên môi trường có bổ sung 9 g/l agar, 20 g/l sucrose và 1 g/l than hoạt tính với nồng độ 1 mg/l 2,4-D, 20 mg/l KIN sau 90 ngày nuôi cấy. Mỗi trường SH có bổ sung 200 ml/l nước dừa non, 9 g/l agar, 20 g/l sucrose và 1 g/l than hoạt tính cho sự hình thành chồi từ các cụm PLB (85% tương đương 9,5 chồi/cụm) sau 90 ngày nuôi cấy. Chồi non được tách ra thành từng chồi đơn để tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường có bổ sung 0,5 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 9 g/l agar, 30 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính.

Từ khóa: Lan hải Tam Đảo, môi trường SH, PLB, sự nảy mầm của hạt, tái sinh chồi

MỞ ĐẦU

Lan hải là một trong những loài Lan cho hoa đẹp và có giá trị kinh tế cao, do đó, chúng đã bị khai thác quá mức ngoài tự nhiên để phục vụ cho mục đích thương mại. Hiện nay, *Paphiopedilum* sp đã được xếp vào một trong những loài Lan bị đe dọa và có nguy cơ tuyệt chủng (Cites, 2008). Mặc dù, một số giống *Paphiopedilum* sp. có khả năng thụ phấn và cho hạt nhiều nhưng tỉ lệ nảy mầm và tạo thành cây con trong tự nhiên là tương đối thấp (Arditti *et al.*, 1993). Hạt giống *Paphiopedilum* sp nảy mầm tương đối chậm do không có nội nhũ, o giống *Paphiopedilum armeniacum* thời gian từ khi hạt nảy mầm, phát triển thành cây tương thành và đẻ nhánh tạo chồi bên mất khoảng 4 năm (Long *et al.*, 2010). Cho đến nay, đã có một số nghiên cứu về phương pháp nhân giống vô tính trên đối tượng Lan hải nhưng khả năng duy trì và nhân nhanh mẫu cây trong thời gian dài cho tỉ lệ thành công là rất thấp (Huang *et al.*, 2001, Lin *et al.*, 2000; Steward *et al.*, 1975). Stewart và đồng tác giả (1975) đã sử dụng đỉnh chồi Lan hải để cảm ứng mô sẹo và tái sinh thành cây con, tuy nhiên, mô sẹo thường chết sau một vài lần cấy chuyển. Lin và đồng tác giả (2000) đã tạo được mô sẹo từ các protocorm-like body (PLB) được nảy mầm từ hạt giống Lan hải lai và cây con được hình thành thông qua PLB từ mô sẹo. Vì vậy, sự tăng sinh

mô sẹo và khả năng tái sinh thấp của các nuôi cấy từ mô sẹo là những trở ngại chính hạn chế khả năng nhân giống trên quy mô lớn của cây Lan hải. Bên cạnh đó, phương pháp nhân giống thông thường thông qua chồi nách từ cây mẹ là không hiệu quả và tốn thời gian (Catherine *et al.*, 1993). PLB là các mô phổ biến nhất cho nghiên cứu chuyển gen và biến đổi di truyền trên đối tượng hoa Phong lan bởi vì chúng nhân lên một cách nhanh chóng và có khả năng tái sinh thành cây con hoàn chỉnh cao (Liau *et al.*, 2003; Sreeramanan *et al.*, 2008). PLB đôi khi được coi như phôi trên đối tượng Phong lan, chúng có cấu trúc đặc biệt, phát triển với hai lưỡng cực chồi và rễ. Vì vậy, các cấu trúc này có thể phát triển thành cây con để dàng khi cấy trên môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng. Hơn nữa, PLB hình thành trực tiếp từ mô phân sinh sẽ ổn định di truyền cao hơn so với những PLB có nguồn gốc từ mô sẹo (Juliana *et al.*, 2010). Nhân giống thông qua PLB thường được sử dụng vì trong một khoảng thời gian ngắn có thể tạo ra một số lượng lớn cây con tương đối đồng đều. Bên cạnh đó, Chyuan và đồng tác giả (2011) cũng đã nhân giống thành công Lan hải thông qua PLB thứ cấp. Mục đích của nghiên cứu này là tìm ra một nguồn mẫu thích hợp cho sự cảm ứng hình thành PLB và xây dựng hoàn chỉnh một phương pháp nhân giống cây Lan hải Tam Đảo nhanh chóng và hiệu quả thông qua con đường hình thành PLB

PHƯƠNG PHÁP VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Trái Lan hải Tam Đảo (*Paphiopedilum gratrixianum*) 8 tháng tuổi tại vườn ươm Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên được dùng làm nguồn vật liệu nuôi cấy ban đầu. Đầu tiên, chúng được rửa bằng xà phòng, sau đó, lã 30 giây trong cồn 70%; sau đó, chúng được khử trùng với $HgCl_2$ 0,1% trong 7 phút và rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần

Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy cho quá trình nảy mầm của hạt là môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962). ½MS (môi trường MS với thành phần đa lượng giảm một nửa), VW (Vacin, Went, 1949), B5 (Gamborg, 1968) và SH (Schenk, Hildebrandt, 1972). Môi trường cảm ứng tạo PLB và nhân nhanh PLB là môi trường SH có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng ở các nồng độ khác nhau.

Điều kiện nuôi cấy *in vitro*

Quá trình nảy mầm của hạt được tiến hành trong tối 60 ngày (Pierik *et al.*, 1988). Sau đó, các bình nuôi cấy được đưa ra nuôi cấy dưới điều kiện chiếu sáng trong 30 ngày. Quá trình cảm ứng và nhân nhanh PLB được tiến hành trong tối 60 ngày và sau đó chuyển sang điều kiện chiếu sáng 30 ngày dưới đèn huỳnh quang.

Quá trình tái sinh cây được thực hiện dưới điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2.500-3.000 lux, nhiệt độ 25±3°C với độ ẩm phòng là 75-85%.

Bố trí thí nghiệm

Khảo sát khả năng nảy mầm của hạt trên các môi trường khác nhau

Trái Lan hải sau khi khử trùng bề mặt được cắt và tách lấy hạt (Hình 1a), mỗi bình nuôi cấy được gieo 500±20 hạt trên 5 môi trường khoảng khác nhau có bổ sung 0,5 mg/l NAA, 0,1 mg/l BA, 9 g/l agar, 20 g/l sucrose và 1 g/l than hoạt tính và pH 5,8. Chi tiêu theo dõi là tỉ lệ nảy mầm của hạt.

Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D lên quá trình cảm ứng tạo PLB

Các hạt sau khi nảy mầm tạo thành các PLB có kích thước từ 1-1,5 mm được lấy dính chồi và nuôi cấy trên môi trường SH có bổ sung 9 g/l agar, 20 g/l

sucrose, 1 g/l than hoạt tính và 2,4-D ở các nồng độ khác nhau (0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mg/l) và pH 5,8. Chi tiêu theo dõi là số PLB hình thành trên mỗi mẫu cấy.

Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D kết hợp với TDZ, BA và KIN lên quá trình nhân nhanh PLB

Các PLB sau khi được cảm ứng được tách ra thành các PLB đơn có kích thước khoảng 1 mm, màu xanh nhạt được nuôi cấy trên môi trường SH có bổ 1,0 mg/l 2,4-D, bổ sung 9 g/l agar, 20 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính và kết hợp với TDZ, BA và KIN ở các nồng độ khác nhau (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg/l) và pH 5,8. Chi tiêu theo dõi là số PLB hình thành trên mỗi mẫu cấy

Khảo sát ảnh hưởng của nguồn gốc PLB khác nhau lên khả năng hình thành chồi

Các cụm PLB tốt nhất thu được trên 3 tổ hợp giữa 1 mg/l 2,4-D với (0,5 mg/l TDZ, 2 mg/l BA, 2 mg/l KIN) ở thí nghiệm trên có kích thước khoảng 0,8 - 1 cm, được nuôi cấy trên môi trường SH không có chất điều hòa sinh trưởng có bổ sung 200 ml/l nước dừa non, 9 g/l agar, 20 g/l sucrose và 1 g/l than hoạt tính, pH 5,8. Chi tiêu theo dõi là tỉ lệ hình thành chồi trên mỗi cụm PLB được cảm ứng từ 2,4-D với 3 loại cytokinine

Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 4 lần, các số liệu được xử lý bằng phần mềm phân tích thống kê SPSS 16.0 theo phương pháp Duncan test với $\alpha = 0,05$ (Duncan, 1995). Đối với thí nghiệm gieo hạt, mỗi lần xử lý 5 bình, mỗi bình 500 hạt. Đối với thí nghiệm cảm ứng và nhân nhanh PLB, mỗi lần xử lý 10 bình, mỗi bình 3 PLB. Đối với thí nghiệm hình thành chồi, mỗi lần xử lý 10 bình, mỗi bình 3 cụm PLB.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khả năng nảy mầm của hạt trên các môi trường khác nhau

Kết quả thu được khi nuôi cấy hạt trên 5 loại môi trường khác nhau cho thấy, các hạt bắt đầu có hiện tượng nứt vỏ và nảy mầm sau 45 ngày nuôi cấy trong tối và khi hạt nảy mầm có thể quan sát thấy các chấm trắng nhỏ li ti trên bề mặt của môi trường. Sau 90 ngày nuôi cấy, chúng phát triển thành PLB hoàn chỉnh có đường kính từ 1-1,5 mm, phần phía trên hình thành một chóp nhọn với 1 lá đầu tiên. Kết quả hạt nảy mầm tốt nhất thu được trên môi trường SH với tỉ lệ 77,5% (Bảng 1, Hình 1b5).

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường khoảng lên sự nảy mầm của hạt Lan hải

Môi trường nuôi cấy	Tỉ lệ hạt nảy mầm (%)
MS	6.50 ^a
1/2MS	17.25 ^a
VW	45.75 ^c
B5	69.50 ^b
SH	77.50 ^a

Chú thích: *Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0.05$ trong Duncan's test

Trên môi trường B5, khả năng nảy mầm của hạt cũng thu được với tỉ lệ tương đối cao (69,5%) (Bảng 1, Hình 1b4) và tỉ lệ nảy mầm giảm dần trên môi trường VW, 1/2MS, MS (Hình 1b3, 1b2, 1b1) tương ứng với tỉ lệ 45,75; 17,25 và 6,5%. Pierik và đồng tác giả (1988) cũng cho rằng tỉ lệ nảy mầm của *Paphiopedilum ciliolare* là thấp (50%) trên môi trường MS. Trong khi đó, Long và đồng tác giả (2010) khi nuôi cấy giống Lan hải lai (*Paphiopedilum villosum* var. *Densissimum*) trên môi trường 1/2MS, MS cho tỉ lệ nảy mầm đạt 21% và 14%. Nhut và đồng tác giả (2005) khi gieo hạt Lan hải hồng trên môi trường MS cho tỉ lệ nảy mầm thấp (9,0%). Kết quả nảy mầm thu được trên môi trường VW cũng phù hợp với nghiên cứu của Long và đồng tác giả (2010) với tỉ lệ 37%. Tỉ lệ nảy mầm của các giống Lan hải phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố. Pierik và đồng tác giả (1988) cho rằng tỉ lệ nảy mầm của hạt bị ức chế bởi môi trường có nồng độ muối khoảng cao như môi trường MS, chu kỳ chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng (3.0 W^{-2}) và nồng độ đường cao (25 g/l). Trong khi đó, Fast (1971) cho rằng, tỉ lệ nảy mầm cao hay thấp còn phụ thuộc vào tuổi của hạt Lan hải, những hạt Lan hải còn non cho tỉ lệ nảy mầm cao hơn so với những hạt trưởng thành. Long và đồng tác giả (2010) khi khảo sát độ tuổi của hạt từ 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 và 300 ngày sau khi thụ phấn, nhận thấy hạt giống ở 120-140 ngày tuổi không nảy mầm và tỉ lệ nảy mầm cao nhất (31%) thu được ở hạt 200 ngày tuổi và tỉ lệ nảy mầm của hạt giảm xuống 13,3% khi hạt giống đạt được 300 ngày tuổi. Kết quả cho tỉ lệ nảy mầm cao cũng được báo cáo bởi một số tác giả như Pierik và đồng tác giả (1988) khi gieo hạt Lan hải *Paphiopedilum ciliolare* trên môi trường Knudson C và 1/2MS cho tỉ lệ nảy mầm của hạt đạt 78% và trên môi trường 1/2MS cho tỉ lệ nảy mầm

68%. Nhut và đồng tác giả (2005) khi gieo hạt Lan hải hồng và thu được kết quả nảy mầm là 90,1% trên môi trường Knudson C và trên môi trường 1/2MS cho tỉ lệ nảy mầm 73,0%. Như vậy, tỉ lệ nảy mầm cao hay thấp phụ thuộc vào nhiều yếu tố (giống, độ tuổi của hạt, môi trường nuôi cấy, hàm lượng đường, ánh sáng...). Trong nghiên cứu này, tỉ lệ nảy mầm cao nhất (77,50%) thu được trên môi trường SH có bổ sung 0,5 mg/l NAA, 0,1 mg/l BA, 9 g/l agar, 20 g/l sucrose và 1 g/l than hoạt tính.

Ảnh hưởng của 2,4-D lên quá trình cảm ứng PLB

Các hạt nảy mầm được nuôi cấy trên môi trường bắt đầu hình thành PLB mới xung quanh phần đỉnh chồi sau 20 ngày và hình thành PLB hoàn chỉnh sau 60 ngày nuôi cấy trong điều kiện tối. Kết quả cho thấy số PLB thu được cao nhất (3,5 PLB/mẫu) trên môi trường SH có bổ sung 1 mg/l 2,4-D (Bảng 2, Hình 1c). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Yung và đồng tác giả (2003) trên đối tượng Lan *Cypripedium formosanum* khi bổ sung vào môi trường 1 mg/l 2,4-D để cảm ứng tạo PLB từ callus do nguồn gốc từ hạt và cho kết quả 1,1 PLB/mẫu sau 8 tuần nuôi cấy. Để cảm ứng tạo PLB từ các miếng PLB có nguồn gốc từ lá Lan hồ điệp *Phalaenopsis* Richard Shaffer 'Santa Cruz', Ishii và đồng tác giả (1998) đã bổ sung 0,1 mg/l 2,4-D vào môi trường nuôi cấy và thu được 2,5 PLB/mẫu, sau 8 tuần nuôi cấy. Trong khi đó, khi tăng nồng độ 2,4-D lên từ 2-4 mg/l thì số lượng PLB thu được giảm dần (Bảng 2), kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Cristian và đồng tác giả (2009) khi nghiên cứu ảnh hưởng của 2,4-D lên quá trình hình thành PLB mới của giống *Cymbidium hybridum* khi nồng độ tăng lên 2 mg/l 2,4-D, các PLB bắt đầu hoại tử sau 60 ngày nuôi cấy và hoại tử nghiêm trọng sau 90 ngày nuôi cấy. Trong nghiên cứu này, quá trình cảm ứng PLB tốt nhất thu được trên môi trường SH có bổ sung 1 mg/l 2,4-D sau 60 ngày nuôi cấy.

Bảng 2. Ảnh hưởng của 2,4-D lên quá trình cảm ứng PLB

2,4-D (mg/l)	Số PLB/mẫu
0	0,0 ^a
0,5	2,4 ^b
1,0	3,5 ^a
2,0	1,7 ^c
3,0	1,5 ^c
4,0	0,75 ^d

Chú thích: *Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test

Ảnh hưởng của sự kết hợp của 2,4-D với TDZ, BA, KIN lên quá trình nhân nhanh PLB

Các PLB thu được ở thí nghiệm trên được dùng làm vật liệu để nhân nhanh PLB trên môi trường SH có bổ sung 1 mg/l 2,4-D kết hợp với 3 loại cytokinine khác nhau. Kết quả ở bảng 3 cho thấy sự kết hợp giữa 1 mg/l 2,4-D với 2 mg/l KIN cho kết quả tốt nhất (11,0 PLB/mẫu) sau 60 ngày nuôi cấy trong điều kiện tối (Hình 1d) và 30 ngày nuôi cấy ở điều kiện chiếu sáng để PLB tiếp tục phát triển (Hình 1e). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Chyuam và đồng tác giả (2011) khi nhân nhanh PLB của giống Lan hải *Paphiopedilum rothschildianum* có nguồn gốc cảm ứng từ 0,86 mg/l KIN trên môi trường ½MS thu được (12,1 PLB/mẫu) sau 8 tuần nuôi cấy. Trong khi đó, sự kết hợp giữa 1 mg/l 2,4-D với 2 mg/l BA kích thích quá trình nhân nhanh PLB tương đối cao (8,0 PLB/mẫu) (Bảng 3), kết quả cũng phù hợp với nghiên cứu của Chyuam và đồng tác giả (2011) khi sử dụng PLB được cảm ứng với 0,9 mg/l BA sau đó cấy chuyển sang môi trường ½MS nhân nhanh PLB và thu được 11 PLB/mẫu. Số lượng PLB trên môi trường SH có bổ sung 1 mg/l 2,4-D và TDZ thu được cao nhất (4,2 PLB/mẫu) và kết quả này giảm dần khi nồng độ TDZ tăng lên từ 0,5-4 mg/l (Bảng 3), kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Jin và đồng tác giả (2008) trên đối tượng *Syngonium podophyllum*, khi tăng nồng độ TDZ từ 2-3 mg/l thì quá trình hình thành PLB giảm từ 71,4-42,9%. Yung và đồng tác giả (2003) khi cố định 1 mg/l 2,4-D và TDZ thay đổi từ 0,1-1 mg/l thì kết quả hình thành PLB giảm từ 6,4-3,4 PLB/mẫu và cao hơn không đáng kể so với khi sử dụng 1 mg/l TDZ đơn lẻ (5,8 PLB/mẫu) trên giống *Cypripedium formosanum*. Ngược lại, khi cố định 3 mg/l TDZ và tăng nồng độ 2,4-D từ 2-2,4 mg/l thì quá trình hình thành PLB cũng giảm từ 1,8-0,25 PLB/mẫu trên giống *Oncidium flexuosum* (Juliana *et al.*, 2010). Trong nghiên cứu Huan và đồng tác giả (2004), khi sử dụng 2,4-D ở nồng độ rất thấp (0,001 mg/l) kết hợp với TDZ để cảm ứng tạo PLB trên đối tượng Địa lan *Cymbidium Twilight Moon 'Day Light'* cho thấy rằng 90% cảm ứng hình thành PLB. Trong khi đó, khi tăng nồng độ 2,4-D lên 0,5 mg/l kết hợp với 0,01-0,1 mg/l TDZ cho kết quả mẫu chết 100%. Trong nghiên cứu này, kết quả tốt nhất cho quá trình nhân nhanh PLB thu được trên môi trường SH có bổ sung 1 mg/l 2,4-D với 2 mg/l KIN.

Ảnh hưởng của nguồn gốc PLB khác nhau lên khả năng hình thành chồi

Sau 90 ngày nuôi cấy trên môi trường không có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật, các PLB được hình thành trên các môi trường có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau cho thấy khả năng hình thành chồi rất khác nhau. Các cụm PLB được cảm ứng trên môi trường 2,4-D và KIN cho khả năng hình thành chồi non cao nhất (85% tương đương 9,35 chồi/cụm) (Bảng 4), các chồi non sinh trưởng và phát triển bình thường, đồng đều và không nhận thấy hiện tượng thủy tinh thể, cùng với sự phát triển của chồi, ở phần gốc của các chồi cũng bắt đầu xuất hiện những rễ non (Hình 1f). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Chyuam và đồng tác giả (2011) khi tái sinh chồi từ PLB có nguồn gốc từ môi trường có bổ sung 0,2 mg/l KIN của giống Lan hải *Paphiopedilum rothschildianum* (10,14 chồi/cụm) và quá trình hình thành chồi giảm còn 7,6 chồi/cụm so với các PLB được cảm ứng ở các nồng độ KIN tăng lên 0,86 mg/l sau 8 tuần nuôi cấy. Hong và đồng tác giả (2008) cho rằng tỉ lệ hình thành chồi tốt nhất (3,0 chồi/mẫu) ở môi trường có bổ sung 1 và 5 mg/l KIN sau 60 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên, có 30% chồi có thủy tinh thể khi sử dụng KIN ở nồng độ 5 mg/l sau 60 ngày nuôi cấy. Trong nghiên cứu này, các cụm PLB được cảm ứng từ môi trường có bổ sung BA và 2,4-D cho thấy khả năng hình thành chồi từ PLB cũng rất cao (66,25% tương đương 5,30 chồi/cụm) (Bảng 3). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Chyuam và đồng tác giả (2011) khi sử dụng các PLB có nguồn gốc từ môi trường có bổ sung 0,22 mg/l BA và thu được (7,3 chồi/cụm) và số chồi hình thành giảm còn (2,3 chồi/cụm) khi các PLB được cảm ứng từ môi trường có bổ sung 0,9 mg/l BA. Kết quả hình thành chồi thấp nhất (52,50% tương đương 2,10 chồi/cụm) (Bảng 4) thu được trên các cụm PLB được cảm ứng từ môi trường với 1 mg/l 2,4-D và 0,5 mg/l TDZ. Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của Huang và đồng tác giả (2001) cho rằng TDZ ức chế sự nhân nhanh chồi trên đối tượng Lan hải. Như vậy, quá trình tái sinh chồi thu được là tốt nhất khi PLB nuôi cấy có nguồn gốc từ môi trường SH có bổ sung 1 mg/l 2,4-D với 2 mg/l KIN.

Chồi được hình thành từ các cụm PLB sau 90 ngày nuôi cấy được tách thành các chồi đơn và cấy vào môi trường SH có bổ sung 0,5 mg/l NAA, 0,5 mg/l

BA, 9 g/l agar, 30 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính (Vũ Quốc Luận *et al.*, 2012) để tạo cây con hoàn

chỉnh có từ 4-5 lá/chồi và rễ sau 90 ngày nuôi cấy (Hình 1g)

Bảng 3. Ảnh hưởng của sự kết hợp của 1 mg/l 2,4-D với TDZ, BA, KIN lên quá trình hình thành và nhân nhanh PLB

Chất điều hòa sinh trưởng thực vật (mg/l)			Số PLB/mẫu
TDZ	BA	KIN	
0.5			4,2 ^{bc}
1.0			3,2 ^{ab}
2.0			2.5 ^a
3.0			2.0 ^a
4.0			1.5 ^a
	0.5		3,75 ^b
	1.0		5,25 ^{cd}
	2.0		8,0 ^b
	3,0		6,0 ^{ab}
	4,0		5,0 ^{ac}
		0.5	6,2 ^{cd}
		1,0	7,2 ^{bc}
		2,0	11,0 ^a
		3,0	8,0 ^b
		4,0	6,2 ^{cd}

Chú thích: *Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test

Bảng 4. Ảnh hưởng của nguồn mẫu được cảm ứng từ 3 phức hợp chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng hình thành chồi từ các cụm PLB

Nguồn gốc PLB được hình thành	Số PLB trung bình/cụm	Số lượng chồi hình thành/cụm(%)
1 mg/l 2,4-D x 0,5 mg/l TDZ	4	52,50 ^a
1 mg/l 2,4-D x 2,0 mg/l BA	8	66,25 ^b
1 mg/l 2,4-D x 2,0 mg/l KIN	11	85,00 ^b

Chú thích: *Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test

KẾT LUẬN

Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy tỉ lệ hạt giống nảy mầm cao nhất (77,5%) trên môi trường SH. Quá trình cảm ứng tạo PLB cao nhất (3,5 PLB/mẫu) thu được trên môi trường có bổ 1 mg/l 2,4-D sau 60 ngày nuôi cấy và quá trình nhân nhanh PLB thu được cao nhất (11,0 PLB/mẫu)

trên môi trường SH có bổ sung 1 mg/l 2,4-D 2 mg/l KIN. PLB được cảm ứng từ môi trường SH có bổ sung 1 mg/l 2,4-D, 2 mg/l KIN cho tỉ lệ tái sinh chồi cao nhất (9,35 chồi/cụm). Các chồi non được tách ra thành chồi đơn để tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường SH có bổ sung 0,5 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 9 g/l agar, 30 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính.



Hình 1 Các bước nhân giống Lan hải Tam Đảo (*Paphiopedilum graxinxianum*) thông qua phát sinh PLB a. Hạt giống Lan hải Tam Đảo (*Paphiopedilum graxinxianum*); b. Hạt giống nảy mầm, 1: MS, 2: 1/2MS, 3: VW, 4: B5, 5. SH; c. PLB hình thành trong tối trên môi trường 2,4-D; d. PLB hình thành trong tối trên môi trường 2,4-D kết hợp với KIN sau 60 ngày nuôi cấy; e. PLB hình thành sau 90 ngày nuôi cấy dưới điều kiện sáng; f. Tái sinh cây con từ PLB thứ cấp; g. Cây con hoàn chỉnh với 4-5 lá sau 90 ngày nuôi cấy.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Nghiên cứu khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện cho chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arditti J, Ernst R (1993) Micropropagation of orchids. John Wiley and Sons, New York. 1560.
- Catherine C (1993) The slipper orchids. Timber Press, Portland 228
- Chyuan YN, Saleh NM (2011) *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchid through formation of protocorm-like bodies. *Plant Cell Tiss Org Cult* 105: 193-202.
- Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora Appendices I, II and III, 2008. Geneva, Switzerland Available at: <http://www.cites.org/eng/app/15-Jul01.pdf>.
- Cristian FB, Gheorghe-Emil B, Ildikó S, Lucia M, Oana-Elena M (2009) *In vitro* reactivity of *Cymbidium hybridum* L. protocorms, on bistratified culture media, using various supernatant sucroses solution. *Analele Universităţii din Oradea, Fascicula Biologie*. 31-37.
- Duncan DB (1995) Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11: 1-42
- Fast G (1971) Versuche zur Anzucht von *Paphiopedilum* aus Samen. *Orchidee* 22: 189-192
- Gamborg O, Miller R, Ojima K (1968) Nutrient requirement suspensions cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50 (1): 151-158.
- Hong PI, Chen JT, Chang WC (2008) Plant regeneration via protocorm-like body formation and shoot multiplication from seed-derived callus of maudiae type slipper orchid. *Acta Physiol Plant* 30: 755-759.
- Huan LVT, Takamura T, Tanaka M (2004) Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Sci* 166:1443-1449
- Huang LC, Lin CJ, Kou CI, Huang BL, Murashige T (2001) *Paphiopedilum* cloning *in vitro*. *Sci Hort* 91: 111-121.

Ishii Y, Takamura T, Goi M and Tanaka M (1998) Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Rep* 17 446-450.

Jin C, Juanxu L, Min D, Jianjun C, Richard J, Henny J (2008) Plant regeneration through protocorm-like bodies induced from nodal explants of *Syngonium podophyllum* 'White Butterfly'. *Hort Sci* 43 (7): 129-2133

Juliana L, Sampaio M, Giulio C, Stancato and Beatriz ADG (2010) Direct regeneration of protocorm-like bodies (PLBs) from leaf apices of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). *Plant Cell Tiss Org* 103 (3) 411-416.

Lee M, Phillips RL (1988) The chromosomal basis of somaclonal. *Am Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39: 413-437.

Liao CH, You SJ, Prasad V, Hsiao HH, Lu JC, Yang NS and Chan MT (2003) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of an *Oncidium* orchid. *Plant Cell Rep* 21: 993-998

Lin YH, Chang C, Chang WC (2000) Plant regeneration from callus culture of a *Paphiopedilum* hybrid. *Plant Cell Tiss Org* 62: 21-25

Long B, Alex X, Niemiera, Zhi-ying C, Chun-lin L (2010) *In vitro* propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae). *Plant Cell Tiss Org* 101:151-162.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497

Như DT, Trang PTT, Vũ NH, Thụy DTT, Khiêm DV.

Tran Thanh Van K (2005) A wounding method and liquid culture in paphiopedilum delatanii propagation. *Prop Orn Plant* 5 (3): 156-161

Pienk RLM, Sprengels PA, Van Der Harst B, Van Der Meys QG (1988) Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz. *In Vitro Sci Hort* 34:139-153

Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50: 199-204

Sreeramanan S, Vinod B, Sashi S, Xavier R (2008) Optimization of the transient Gusa gene transfer of *Phalaenopsis violacea* orchid via *Agrobacterium tumefaciens*: an assessment of factors influencing the efficiency of gene transfer Mechanisms. *Adv Nat Appl Sci* 2 77-88

Steward J, Button J (1975) Tissue culture in *Paphiopedilum*. *Amer Orch Soc Bull* 44: 591-599

Vacin E, Went F (1949) Some pH changes in nutrient solution. *Bot Gar Conser New* 110: 605-613.

Vũ Quốc Luân, Nguyễn Phúc Huy, Hoàng Xuân Chiến, Trịnh Thị Hương, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Bá Nam, Đỗ Khắc Thịnh, Dương Tấn Nhựt (2012) Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây lan vằn hải (*Paphiopedilum callosum*). *Công nghệ sinh học* 10 (3) 497-505

Yung L, Nean L (2003) Plant regeneration from protocorm-derived callus of *Cypripedium formosanum*. *In Vitro Cell Dev Plant* 39: 475-479

IN VITRO PROPAGATION OF PAPHIOPEDILUM GRAXTRIXIANUM THROUGH PROTOCOL-LIKE BODY INDUCTION FROM SEEDS

Vu Quoc Luan¹, Nguyen Phuc Huy¹, Do Khắc Thịnh², Duong Tan Nhut^{1,*}

¹Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

²Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam, Vietnam Academy of Agricultural Sciences

SUMMARY

In the present study, effects of medium formulation and PGRs on seed germination and PLB and shoot formation of *Paphiopedilum graxtrixianum* were examined. The results showed that the best medium formulation for *Paphiopedilum graxtrixianum* seed germination (77.50%) was SH medium supplemented with 0.5 mg/l NAA, 0.1 mg/l BA, 9 g/l agar, 20 g/l sucrose and 1 g/l activated charcoal. Explants were cultured on media containing 1 mg/l 2,4-D after 60 days of culture on media with 9 g/l agar, 20 g/l sucrose, 1 g/l activated charcoal and 1mg/l 2,4-D in combination with 2 mg/l KN after 90 days of culture resulted in the high efficiency in PLB induction (3.5 PLBs/explant) and PLB proliferation (11 PLBs/explants) respectively. Moreover, PLBs derived from cultures on different media led to considerable differences in shoot formation. The best shoot formation (9.5 shoots/clump) was achieved when PLBs forming on media supplemented with the combination of 1 mg/l 2,4-D and 2 mg/l KN were transferred into SH media containing 20% (v/v) coconut

* Author for correspondence: Tel: +84-63-3831056; Fax: +84-63-3831028, E-mail: duongtannhut@gmail.com

water, 9 g/l agar, 20 g/l sucrose and 1 g/l activated charcoal. The successful plant regeneration was observed when single shoots were cultured on media with 0.5 mg/l BA, 0.5 mg/l NAA, 9 g/l agar, 30 g/l sucrose and 1 g/l activated charcoal.

Keywords: *Paphiopedilum gratrixianum*, *PLB*, seed germination, *SH* medium, shoot regeneration