

TÁI SINH CÂY LAN VÂN HẢI (*PAPHIOPEDILUM CALLOSUM*) THÔNG QUÁ MÔ SEOTƯ LÁT CẮT NGANG CỦA LÔNG THÂN *EX VITRO*

Vũ Quốc Luận¹, Nguyễn Phúc Huy¹, Đỗ Khắc Thịnh², Dương Tấn Nhật¹

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây 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

Lan Hải (*Paphiopedilum* sp.) là một trong những loài hoa lan rất khó thực hiện nhân giống vô tính thông qua giai đoạn trung gian từ callus. Phương pháp vào mẫu trực tiếp từ các chồi non *ex vitro* thường cho tỉ lệ thành công rất thấp. Do đó, việc tìm ra một nguồn vật liệu mới có khả năng cảm ứng tạo callus và tái sinh thành cây hoàn chỉnh là hết sức cần thiết. Trong nghiên cứu này, các chồi non 1 tháng tuổi ngoài vườn ươm của lan Vân Hải (*Paphiopedilum callosum*) được đặt trong điều kiện che tối ngắt quãng nhằm kéo dài các lông thân và gia tăng số mẫu cây cũng như dễ dàng thực hiện các lát cắt ngang từ các lông thân. Kết quả cho thấy, tỷ lệ cảm ứng callus từ lát cắt ngang của lông thân *ex vitro* thu được cao nhất (31,25%) sau 75 ngày nuôi cấy trên môi trường SH lỏng với giá thể bông gòn có bổ sung 30 g/l sucrose, 1,0 mg/l TDZ, 1,0 mg/l 2,4-D, pH = 5,8. Môi trường tối nhất cho quá trình nhân nhanh callus thu được trên môi trường tương tự và có bổ sung thêm 9 g/l agar. Quá trình tái sinh chồi tốt nhất (8 chồi/mẫu) thu được trên môi trường SH có bổ sung 30 g/l sucrose, 0,3 mg/l TDZ, 0,5 mg/l NAA, 9 g/l agar. Sau đó, các chồi được tạo cây hoàn chỉnh và trồng ra ngoài vườn ươm với tỉ lệ sống đạt là 100%.

Từ khóa: Callus, kéo dài chồi, lan Vân Hải, lông thân, tái sinh cây

MỞ ĐẦU

Lan Vân Hải (*Paphiopedilum callosum*) là một trong những loài lan có khu phân bố tương rộng ở khu vực Đông Nam Á như Thái Lan, Lào, Campuchia và Việt Nam. Chúng có hoa to, đẹp và thời gian nở hoa ngoài tự nhiên từ tháng 4 đến tháng 8 (Leonid *et al.*, 2004). Hiện nay, để thu được cây con trên đối tượng lan Hải, các nhà nghiên cứu đã thực hiện nhiều phương pháp nhân giống khác nhau như gieo hạt (Pierik *et al.*, 1988). Phương pháp kích thích tạo chồi bên từ cây con *in vitro* có nguồn gốc từ hạt (Huang *et al.*, 2001). Nhut và đồng tác giả (2007) đã sử dụng phương pháp kéo dài đốt thân *in vitro* để gia tăng hệ số mẫu cây. Phương pháp vào mẫu trực tiếp từ các chồi non cũng được nghiên cứu (Luan *et al.*, 2012) nhưng tỉ lệ thành công là rất thấp. Phương pháp nhân giống thông qua mô sẹo được cảm ứng từ các PLB có nguồn gốc từ hạt cũng đã được thực hiện (Lin *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2008; Bo *et al.*, 2010; Chuyam *et al.*, 2011). Trong bài báo này, chúng tôi đã kéo dài chồi lan Vân Hải trong điều kiện che tối ngắt quãng tạo nguồn mẫu phục vụ cho việc tái sinh cây lan Vân Hải thông qua sự hình thành mô sẹo từ lát cắt ngang lông thân *ex vitro*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Vật liệu nghiên cứu là những chồi non lan Vân Hải 1 tháng tuổi ngoài vườn ươm có chiều cao 1 cm được đưa vào trong điều kiện tối 14 ngày sau đó được chuyển ra điều kiện chiếu sáng 1 ngày để cây quang hợp và tiếp thu năng lượng cho chu kỳ tiếp theo. Chu kỳ được lặp lại 7 lần liên tục nhằm kéo dài chồi phục vụ cho quá trình cảm ứng tạo callus ban đầu.

Môi trường nuôi cấy và khử trùng mẫu cấy

Môi trường cảm ứng tạo callus, nhân nhanh và tái sinh chồi là môi trường SH (Schenk, Hildebrandt, 1972) lỏng với giá thể bông gòn hoặc được làm đông bằng agar và bổ sung 2,4-D riêng lẻ hoặc kết hợp với TDZ, BA, 30 g/l đường sucrose, pH của môi trường được điều chỉnh về 5,8 bằng NaOH 1N hoặc HCl 10% trước khi hấp khử trùng ở 121°C, áp suất 1 atm trong 30 phút. Đối với nghiên cứu cảm ứng tạo callus và nhân nhanh: callus được nuôi trong điều kiện tối 60 ngày sau đó được chuyển sang điều kiện chiếu sáng 15 ngày. Nghiên cứu tái sinh chồi từ callus được nuôi cấy dưới ánh sáng đèn huỳnh quang (2.500 - 3.000 lux), thời gian chiếu sáng 16/8 giờ (sáng/tối) và nhiệt độ phòng 25 ± 3°C. Chồi non có chiều cao trung bình 9 cm được tách phần phiến lá bên ngoài, rửa sạch bề mặt mẫu cấy và khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% trong 6 phút và rửa lại bằng nước cất vô trùng 4-5 lần (Luan *et al.*, 2012).

Cảm ứng tạo callus từ mẫu chồi non *ex vitro* được kéo dài trong điều kiện tối ngắt quãng

Các chồi *ex vitro* 120 ngày tuổi sau khi xử lý trong điều kiện tối ngắt quãng được tiến hành khử trùng và cắt thành từng đốt riêng biệt. Sau đó, các đốt này được nuôi cấy trên môi trường SH lỏng với giá thể bông gòn có bổ sung 2,4-D (0,0; 0,3; 0,6; 1,0 mg/l) riêng lẻ hoặc kết hợp với TDZ (0,0; 0,3; 0,6; 1,0 mg/l), 30 g/l sucrose.

Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên quá trình nhân nhanh callus

Các khối callus được hình thành sau 75 ngày nuôi cấy được cắt thành các phần bằng nhau có trọng lượng tươi khoảng 0,1 (g) và cấy chuyển trên môi trường SH có bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D và kết hợp với 0,0; 0,3; 0,6; 1,0 mg/l TDZ, 9 g/l agar, 30 g/l đường sucrose.

Ảnh hưởng của sự kết hợp giữa auxin và cytokinin lên quá trình tái sinh chồi từ callus

Các cụm callus có trọng lượng tươi 0,25 g thu được từ thí nghiệm nhân nhanh được giữ nguyên và nuôi cấy trên các môi trường SH có bổ sung NAA, BA, TDZ, 9,0 g/l agar, 30 g/l sucrose, pH = 5,8 nhằm đánh giá tác động của chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng tái sinh chồi từ callus.

Xử lý số liệu

Đối với nghiệm thức cảm ứng tạo callus, nhân nhanh và tái sinh chồi mỗi lần xử lý 20 mẫu với 1 mẫu/bình. Các thí nghiệm được lặp lại 4 lần. Số liệu được xử lý bằng phần mềm phân tích thống kê SPSS 16.0 theo phương pháp Duncan test với $\alpha = 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát khả năng cảm ứng tạo callus từ mẫu chồi non ex vitro được kéo dài trong điều kiện tối ngắn quang

Các chồi non sau khi được khử trùng, cắt ngang giữa các lóng thân và cấy lên môi trường cảm ứng tạo callus (Bảng 1). Kết quả thu nhận sau 75 ngày nuôi cấy cho thấy các lát cắt của lóng thân hình thành callus trên môi trường chỉ bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D là rất thấp (6,25%). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Lin và đồng tác giả (2000) khi cảm ứng tạo callus từ PLB có nguồn gốc từ hạt thu được kết quả (5%) của giống lan Vân Hải tại Lee và đồng tác giả (2003) tạo callus thành công từ PLB có nguồn gốc từ hạt của giống *Cypripedium formosanum* trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS – $\frac{1}{2}$ MS có bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D thu được 5,6 – 11,6% tạo mô sẹo. Sự kết hợp giữa 2,4-D và TDZ cho thấy kết quả hình thành callus từ các lát cắt lóng thân gia tăng đáng kể. Trên môi trường có sự kết hợp từ (0,3 – 1,0 mg/l) 2,4-D và (0,5 – 1,0 mg/l) TDZ, các mẫu cấy cảm ứng tạo callus cao nhất (31,25%) thu được trên môi trường có bổ sung 1 mg/l 2,4-D kết hợp với 1 mg/l TDZ (Bảng 1). Các lát cắt lóng thân cảm ứng tạo callus chủ yếu trên các lóng non ở phần ngọn chồi (Hình 1 A, B). Sự cảm ứng tạo callus từ các lóng thân cho kết quả không cao một phần là do tuổi của mẫu. Khi quan sát các mẫu già nằm ở phần gốc không nhận thấy có sự hình thành callus mà chủ yếu là hình thành chồi từ các mắt thân. Tỷ lệ hình thành callus từ các lát cắt lóng thân của chúng tôi thấp hơn nghiên cứu của Lin và đồng tác giả (2000) khi kết hợp 1 mg/l 2,4-D với 1 mg/l TDZ cho tỷ lệ hình thành callus (45%) và cao nhất (65%) thu được ở nồng độ 10 mg/l 2,4-D với 0,1 mg/l TDZ. Kết quả nghiên cứu của Lee và đồng tác giả (2003) cũng cho thấy tỷ lệ cảm ứng callus từ PLB cao (55,8%) trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS có bổ sung 1 mg/l 2,4-D với 1 mg/l TDZ nhưng khi nuôi cấy trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS với nồng độ 2,4-D và TDZ tương tự thì thu được kết quả thấp hơn (19,7%). Như vậy, kết quả cảm ứng hình callus cao hay thấp phụ thuộc vào nhiều yếu tố như giống, nguồn mẫu, tuổi của mẫu cấy và môi trường nuôi cấy. Trong nghiên cứu này, lát cắt lóng thân ex vitro của giống lan Vân Hải thu được kết quả tạo callus tốt nhất (31,25%) trên môi trường SH lóng với giá thể bông gòn có bổ sung 1 mg/l 2,4-D kết hợp với 1 mg/l TDZ, 30 g/l sucrose.

Bảng 1. Ảnh hưởng của cảm ứng tạo callus từ mẫu chồi non ex vitro được kéo dài trong điều kiện tối ngắn quang

Chất điều hòa sinh trưởng		Tỷ lệ hình thành callus
2,4-D (mg/l)	TDZ (mg/l)	(%)
0,0	0,0	0,00 ^a
0,3	0,0	0,00 ^a
0,6	0,3	0,00 ^a
1,0	0,0	6,25 ^d
0,0	0,5	0,00 ^a
0,3	0,5	0,00 ^a
0,6	0,5	5,00 ^d
1,0	0,5	15,0 ^e
0,0	1,0	9,00 ^c
0,3	1,0	7,50 ^d
0,6	1,0	20,00 ^b
1,0	1,0	31,25 ^a

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

Khảo sát ảnh hưởng của TDZ và 2,4-D lên quá trình nhân nhanh callus

Kết quả thu nhận sau 75 ngày nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 2,4-D kết hợp với TDZ cho thấy có sự gia tăng trong lượng tươi của callus được thể hiện ở Bảng 2. Trên môi trường không bổ sung TDZ, các cụm callus có màu vàng nhạt, xốp sau 45 ngày, sau đó, chúng hóa nâu và hoại tử sau 75 ngày nuôi cấy. Khi bổ sung TDZ vào môi trường nuôi cấy, mẫu có sự gia tăng rõ rệt về trọng lượng tươi và đạt cao nhất (0,24 g/mẫu) ở nồng độ (1,0 mg/l) TDZ sau 60 ngày nuôi cấy (Bảng 2), các khối callus có màu vàng tươi và tạo thành một khối chắc.

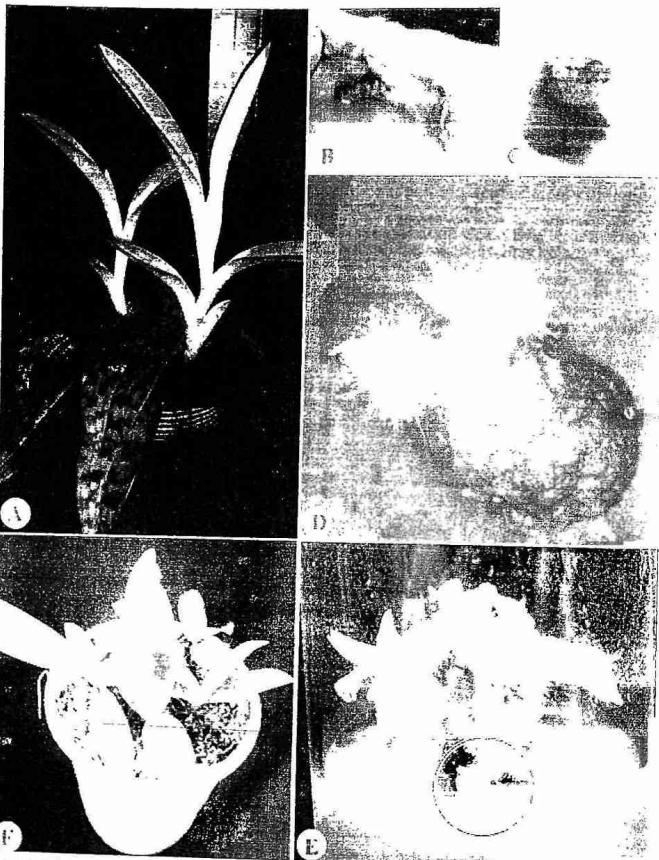
Bảng 2. Ảnh hưởng của TDZ và 2,4-D lên quá trình nhân nhanh callus sau 75 ngày nuôi cấy

Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)		Trọng lượng tươi/mẫu
2,4-D	TDZ	(g)
1,0	0,0	0,14 ^c
1,0	0,3	0,19 ^b
1,0	0,6	0,22 ^a
1,0	1,0	0,24 ^a

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

Quá trình nhân nhanh callus trên môi trường có bổ sung 1,0 mg/l TDZ và 1,0 mg/l 2,4-D của chúng tôi cho thấy cao hơn so với nghiên cứu của Lin và đồng tác giả (2000) trên cùng nồng độ ini dat (0,161 g/mẫu) và khi tăng nồng độ lên 5 mg/l 2,4-D đạt (0,224 g/mẫu). Trên môi trường nhân nhanh callus khi bổ sung 2,4-D và TDZ của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Lee và đồng tác giả (2003) đã bổ sung vào môi trường 1,0 mg/l 2,4-D kết hợp với 1,0 mg/l TDZ để nhân nhanh callus trên giống *Cypripedium formosanum* (thuộc chi lan Hải *Paphiopedilum*). Hong và đồng tác giả (2008) nhân nhanh callus trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS có bổ sung 5,0 mg/l 2,4-D kết hợp 1,0 mg/l TDZ của giống lan Hải (*Paphiopedilum*

Alma Gavaert). Callus hình thành trên môi trường có bổ sung 2,4-D kết hợp với TDZ có khả năng nhân nhanh và tái sinh thành cây hoàn chỉnh trên giống Địa Lan (*Cymbidium ensifolium*) (Chang et al., 1998). Trong nghiên cứu này, môi trường SH có bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D, 1,0 mg/l TDZ, 30 g/l sucrose và 9 g/l agar là thích hợp cho quá trình nhân nhanh callus và duy trì mẫu trong thời gian dài.



Hình 1. A: Chồi non đặt trong điều kiện tối ngắt quang sau 120 ngày. B, C: Callus hình thành ở mặt dưới và mặt trên của lát cắt tóng thân *ex vitro* sau 70 ngày nuôi cấy. D, E: Tái sinh chồi từ callus sau 120 ngày nuôi cấy. F: Cây con sống sót ngoài vườn ươm trên giá thể dớn Đài Loan sau 6 tháng.

Khảo sát ảnh hưởng của sự kết hợp giữa auxin và cytokinin lên quá trình tái sinh chồi từ callus

Kết quả các cụm chồi được thu nhận trên môi trường tái sinh sau 120 ngày nuôi cấy. Trên môi trường không bổ sung BA và TDZ, kết quả cho thấy không có sự hình thành chồi từ callus, các cụm callus chuyển dần sang màu nâu và hoại tử sau 120 ngày nuôi cấy. Ngược lại, các cụm callus được cấy trên môi trường có bổ sung BA và TDZ xuất hiện các đốm màu xanh dạng PLB sau 60 ngày nuôi cấy và hình thành cụm chồi sau 120 ngày nuôi cấy. Trên môi trường có bổ sung 2,0 mg/l BA cho kết quả tốt nhất thể hiện qua số cụm callus tái sinh chồi (51,25%) và số chồi hình thành trung bình trên mỗi cụm là 4,75 chồi/mẫu (Bảng 3). Nhưng khi quan sát về hình thái của callus sau 120 ngày nuôi cấy cho thấy, sau khi hình thành các cụm chồi, các cụm callus đều hóa nâu và hoại tử (Hình 1. D). Sự kết hợp giữa BA và NAA trong nghiên cứu của chúng tôi cho tỷ lệ tái sinh cao hơn so với nghiên cứu của Bo và đồng tác giả (2010) trên hai giống lan Hải (Paphiopedilum villosum, Paphiopedilum armeniacum), chỉ tạo được 1 chồi/mẫu. Trên môi trường có bổ sung 0,3 mg/l TDZ tỷ lệ tái sinh cụm chồi từ callus thu được cao nhất 60% (Bảng 3) và số chồi hình thành trung bình trên mỗi cụm là cao nhất 8 chồi/mẫu (Hình 1. E). Trong khi các cụm callus già chuyển sang màu nâu và hoại tử thì có sự nhận lên của các cụm callus mới, màu vàng tươi thích hợp cho quá trình nhân nhanh và tái sinh cụm chồi (Hình 1. E). Kết quả của quá trình hóa nâu và hoại tử của callus khi môi trường không có bổ sung BA và TDZ của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Lin và đồng tác giả (2000) trên đối tượng lan Hải lại (Paphiopedilum callosum x Paphiopedilum lawrenceanum). Trong khi đó, trên môi trường có bổ sung BA của chúng tôi thì ngược lại so với kết quả của Lin và đồng tác giả (2000) cho thấy không có sự hình thành cụm chồi từ callus. Kết quả thu được cho thấy phù hợp với nghiên cứu của Lin và đồng tác giả (2000) cho số chồi trung bình 7 chồi/mẫu và khi nồng độ TDZ tăng lên 3,0 mg/l sự hình thành cụm chồi giảm còn 3 chồi/mẫu. Quá trình tái sinh chồi thành công từ callus có nguồn gốc từ hạt của lan Hải cũng được nghiên cứu bởi các tác giả khi sử dụng auxin và cytokinin riêng lẻ như IAA, NAA, Kinetin, Zeatin trên đối tượng lan Hải (Paphiopedilum Alma Gavaert) (Hong et al., 2008), BA, Kinetin trên đối tượng lan Hải (Paphiopedilum Rothschildianum) (Chyuan et al., 2011). Trong nghiên cứu này, chồi tái sinh từ callus trên đối tượng lan Văn Hải thu được cao nhất (8 chồi/mẫu) khi nuôi cấy trên môi trường SH có bổ sung 0,3 mg/l TDZ, 0,5 mg/l NAA, 9 g/l agar và 30 g/l sucrose.

Sau đó, các cụm chồi có nguồn gốc từ callus được tách thành các chồi đơn và cấy trên môi trường SH có bổ sung 0,5 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 30 g/l sucrose, 9 g/l agar và 1,0 g/l than hoạt tính để tạo cây con đầy hoàn chỉnh (Luan et al., 2012) sau 90 ngày nuôi cấy không nhận thấy bất kỳ sự biến dị về mặt hình thái. Cây con từ 4 - 5 lá và rễ được trồng ra ngoài vườn ươm với giá thể dớn Đài Loan cho tỷ lệ sống sót 100% sau 6 tháng (Hình 1. F).

Bảng 3. Ảnh hưởng của sự kết hợp giữa auxin và cytokinin lên quá trình tái sinh chồi từ callus

Chất điều hòa sinh trưởng			Tỷ lệ callus tái sinh chồi (%)	Số chồi trung bình/mẫu
NAA	BA	TDZ		
0,5	0,0	0,0	0,00 ^a	0,00 ^d
0,5	0,5	0,0	11,25 ^d	3,25 ^e
0,5	1,0	0,0	43,75 ^e	3,25 ^e
0,5	2,0	0,0	51,25 ^b	4,75 ^b
0,5	0,0	0,3	60,00 ^a	8,00 ^a
0,5	0,0	0,6	43,75 ^c	4,75 ^b
0,5	0,0	1,0	30,00 ^f	3,25 ^e

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

KẾT LUẬN

Tỷ lệ cảm ứng tạo mô sẹo từ lát cắt ngang của lông thần cao nhất (31,25%) thu được trên môi trường SH lỏng có bổ sung 1,0 mg/l 2,4-D, 1,0 mg/l TDZ, 30 g/l sucrose với giá thể bông gòn sau 75 ngày nuôi cấy. Các khối callus được nhân nhanh trên môi trường tương tự và có bổ sung thêm 9 g/l agar. Các chồi tái sinh từ callus cao nhất trên môi trường SH có bổ sung 0,3 mg/l TDZ, 0,5 mg/l 2,4-D, 30 g/l sucrose, 9 g/l agar. Môi trường SH có bổ sung 0,5 mg/l NAA và 0,5 mg/l BA, 30 g/l sucrose, 9 g/l agar và 1 g/l than hoạt tính thích hợp cho sự sinh trưởng và tạo cây hoàn chỉnh. Cây con có từ 4-5 lá và rễ sau đó được trồng ra ngoài vườn ươm với giá thể dớn Đài Loan cho tỷ lệ sống sót 100% sau 6 tháng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bo L, Alex X, Niemiera, Zhi-ying C, Chun-lin L (2010) *In vitro* propagation of four threatened Paphiopedilum species (Orchidaceae). Plant Cell Tiss Org Cult, 101: 151-182.
- Chang C, Chang WC (1998) Plant regeneration from callus culture of Cymbidium ensifolium var. misoricos. Plant Cell Rep, 17:251-255
- Chyuan YN, SalehNM (2011) *In vitro* propagation of Paphiopedilum orchid through formation of protocorm-like bodies. Plant Cell Tiss Org Cult, 105: 193-202
- 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.
- Huang LC, Lin CJ, Kou CI, Huang BL, Murashige T (2001) Paphiopedilum cloning in vitro. Sci Hort, 91: 111-121.
- Lee YI, Lee N (2003) Plant regeneration from protocorm-derived callus of Cypripedium formosanum. In Vitro Cell Dev-Pl, 39:475-479.
- Leonid Averyanov, Philip Cribb, Phan Kế Lộc, Nguyễn Tiến Hiệp (2004) Lan Hải Việt Nam. Nhà xuất bản Giao Thông Vận Tải.
- Lin YH, Chen C, Chang WC (2000) Plant regeneration from callus culture of a Paphiopedilum hybrid Plant Cell Tiss Org Cult, 62: 21-25.

Luan VQ, Huy NP, Chien HX, Huong TT, Hien VT, Nam NB, Thinh DK, Nhut DT (2012) Micropropagation of *Paphiopedilum callosum*. *J Sci Technol*, 10(3): 487-494.

Nhut DT, Thuy DTT, Don NT, Luan VQ, Hai NT, Tran Thanh Van K, Chinnappa CC (2007) Stem elongation of *Paphiopedilum delenatii* Guillaumin and shoot regeneration via stem node culture. *Prop Orn Plant*, 7(1): 29-36

Pienk RLM, Sprengels PA, Van DH, Van DMQG (1988) Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Plitz *in vitro*. *Sci Hort*, 34:139-153.

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

PLANT REGENERATION OF *PAPHIOPEDILUM CALLOSUM* THROUGH CALLUS INDUCTION FROM *EX VITRO* STEM NODE

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

A considerable amount of report has been published on *Paphiopedilum* sp. since this variety is one of the most recalcitrant plant species for micropropagation via callus formation. Normally, utilizing *ex vitro* young shoots as source material gives low frequency of calligenesis. Thus, it is necessary to determine a high potential plant material not only for callus formation but also for plant regeneration. In the present study, one-month old *ex vitro* shoots of *Paphiopedilum callosum* were exposed to dark light cycles of 14d/1d for stem elongation with the main objective of increasing the number of nodes and the feasibility of performing node cutting. The results showed that after 75 days of culture the highest calligenesis rate (31.25%) was obtained on liquid SH medium containing 30 g/l sucrose, 1.0 mg/l TDZ, 1.0 mg/l 2,4-D and cotton wool as the support matrix. The most suitable media for callus growth was medium with the above composition supplemented with 9 g/l agar as the gelling agent but not cotton wool. The best plant regeneration (8 shoots/explant) was achieved on SH media containing 30 g/l sucrose, 0.3 mg/l TDZ, 0.5 mg/l NAA and 9 g/l agar. Maximum survival rate (100%) was achieved when rooted *in vitro* plants with 4-5 open leaves were transplanted to *ex vitro* conditions.

Keywords. Callus, node, *Paphiopedilum callosum*, plant regeneration, shoot elongation

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