

NHÂN CHỒI THÔNG QUA NUÔI CẤY ĐỐT THÂN HÌNH THÀNH TRONG TỐI: MỘT PHƯƠNG PHÁP MỚI TRONG NHÂN GIỐNG CÂY LAN KIM HẢI (*PAPHIOPEDILUM VILLOSUM*)

Nguyễn Phúc Huy, Đặng Thị Tinh, Vũ Quốc Luận, Hoàng Thanh Tùng, Vũ Thị Hiền, Dương Tấn Nhựt✉

Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: duongtannhut@gmail.com

Ngày nhận bài: 24.10.2017
Ngày nhận đăng: 28.12.2017

TÓM TẮT

Lan Kim Hải (*Paphiopedilum villosum*) là một loài lan đẹp, có giá trị kinh tế cao. Tuy nhiên, loài lan này khó nhân giống vô tính. Cho tới nay, có rất ít công bố về nhân giống vô tính thành công trên đối tượng này. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên sự tái sinh chồi từ nuôi cấy đốt thân của chồi lan Kim Hải *in vitro* kéo dài trong tối được nghiên cứu. Chồi non lan Kim Hải *in vitro* (1,5 cm) được nuôi cấy dưới điều kiện tối hoàn toàn trong 3 tháng nhằm kéo dài chồi và tạo thành các đốt riêng biệt. Các đốt riêng biệt được cấy trên môi trường SH và bổ sung riêng lẻ BA, KIN hoặc TDZ để khảo sát khả năng tái sinh chồi. Hiệu quả nhân chồi cũng được ghi nhận trong nghiên cứu này. Kết quả kéo dài đốt thân trong điều kiện tối có chiều cao tốt nhất (5,25 cm) và số đốt nhiều nhất (3,00 đốt/chồi). Các mẫu đốt thân được cấy trên môi trường SH có bổ sung 30 g/L sucrose, 8 g/L agar, 1 g/L than hoạt tính và kết hợp riêng lẻ với các nồng độ khác nhau của BA, KIN và TDZ. Sau 3 tháng nuôi cấy, kết quả cho thấy tỷ lệ tái sinh chồi từ đốt thân tốt nhất (85%) và hệ số nhân chồi cao nhất (6,6 chồi/đốt thân) khi mẫu đốt thân được cấy trên môi trường SH bổ sung 0,5 mg/L TDZ, 30 g/L sucrose, 8 g/L agar và 1 g/L than hoạt tính. Những chồi thu từ thí nghiệm trên được cấy sang môi trường ra rễ MS bổ sung 0,3 mg/L NAA cho sự tái sinh rễ cao nhất (6,6 rễ/chồi) sau 1 tháng và tỷ lệ sống sót cao (100%) sau 3 tháng chuyển ra ngoài vườn ươm khi trồng trên giá thể dớn Đài Loan.

Từ khóa: Nhân giống *in vitro*, nuôi cấy đốt thân, *Paphiopedilum villosum*, sự kéo dài chồi

MỞ ĐẦU

Lan Kim Hải (*Paphiopedilum villosum*) là một trong những loài lan cho hoa đẹp, có giá trị về mặt thẩm mỹ và giá trị kinh tế cao (Hình 1). Hiện nay, số lượng của loài này ngoài tự nhiên đang suy giảm nghiêm trọng do bị khai thác quá mức (Cites, 2008).

Cho đến nay, hầu hết các nghiên cứu thường sử dụng cây con có nguồn gốc từ hạt để làm vật liệu cho các nghiên cứu nhân nhanh bằng cách kích thích tạo chồi bên (Stewart, Button, 1975; Arditti, Ernst, 1993; Huang *et al.*, 2001; Chyuam *et al.*, 2010; Patcharawadee *et al.*, 2011); tuy nhiên, phương pháp này tạo ra những cây con không đồng nhất về mặt di truyền. Ngoài ra, trên đối tượng lan Hải Hồng (*Paphiopedilum delenatii*) một số phương pháp nghiên cứu được sử dụng như phương pháp gây vết thương và phương pháp kéo dài đốt thân *in vitro* để tăng hệ số nhân chồi (Nhut *et al.*, 2005, 2007); Vũ Quốc Luận và đồng tác giả (2014) đã sử dụng thành

công phương pháp cắt đốt và trồng trực tiếp ra vườn ươm cây lan Hải Hồng. Năm 2013, Trần Thị Bích Hạnh và đồng tác giả đã khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng và mật độ mẫu cấy của lan Kim Hải lên sự sinh trưởng và phát triển của chồi; tuy nhiên trong nghiên cứu này tác giả không chú trọng vào nghiên cứu tạo chồi bên. Mặc khác, nghiên cứu về nhân giống trên đối tượng lan Kim Hải còn hạn chế và chưa có nghiên cứu nào sử dụng phương pháp nuôi cấy đốt thân trong nhân chồi loài lan này. Chính vì vậy, nghiên cứu này chúng tôi sử dụng nguồn mẫu từ những đốt thân *in vitro* kéo dài trong tối cũng như khảo sát ảnh hưởng của cytokinin lên khả năng hình thành chồi bên, nhằm mục đích nâng cao hiệu quả nhân chồi lan Kim Hải.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Quả của cây lan Kim Hải (*P. villosum*) thu nhận

từ vườn ươm của Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên được khử trùng và tách lấy hạt gieo trên môi trường Knudson C (Knudson, 1946) trong 3 tháng. Sau đó, chồi non được cấy chuyển sang môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) bổ sung 2,0 mg/L N⁶-Benzyladenine (BA) (Nhut *et al.*, 2005) để tạo những chồi có kích thước đồng đều (1,5 cm) để sử dụng làm vật liệu trong nghiên cứu này.

Môi trường nuôi cấy là môi trường SH (Schenk, Hildebrandt, 1972) hoặc MS có bổ sung 30 g/L sucrose, 8 g/L agar, 1 g/L than hoạt tính và các chất điều hòa sinh trưởng BA, 6-Furfuraminopurine (KIN) hoặc 1-phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)-urea (TDZ) ở các nồng độ khác nhau tùy thuộc vào mục đích của từng thí nghiệm. pH môi trường được điều chỉnh về 5,8 trước khi được hấp khử trùng ở 1 atm, 121°C trong 30 min.



Hình 1. Cây lan Kim Hải (*Paphiopedilum villosum*)

Phương pháp

Kéo dài đốt thân lan Kim Hải *in vitro* dưới các điều kiện chiếu sáng khác nhau

Nghiên cứu này sử dụng phương pháp kéo dài đốt thân *in vitro* của Vũ Quốc Luận và đồng tác giả (2014). Chồi non lan Kim Hải *in vitro* (1,5 cm) được

nuôi cấy dưới điều kiện tối hoàn toàn trong 3 tháng nhằm kéo dài chồi và tạo thành các đốt riêng biệt. Đối chứng là nuôi cấy chồi trong điều kiện sáng 16/8 h (sáng/tối).

Tái sinh chồi từ đốt thân của lan Kim Hải sau 3 tháng nuôi cấy

Chồi non lan Kim Hải *in vitro* sau 3 tháng kéo dài được cắt thành từng đốt riêng biệt và cấy trên môi trường SH và bổ sung riêng lẻ BA, KIN (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L) hoặc TDZ (0,0; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0 mg/L) để khảo sát khả năng tái sinh chồi. Hiệu quả nhân chồi được so sánh thông qua:

Hệ số nhân chồi = Tỷ lệ nhân chồi x số chồi/đốt thân.

Đối chứng là các chồi lan Kim Hải không kéo dài đốt thân được cấy trên môi trường SH bổ sung 0,5 mg/L TDZ từ thí nghiệm trên.

Tạo cây hoàn chỉnh từ các nguồn mẫu khác nhau

Các chồi đơn lan Kim Hải (1,5 cm) tách từ cụm chồi tái sinh tốt nhất thu được từ môi trường bổ sung nồng độ 1,0 mg/L BA, 1,0 mg/L KIN, 0,5 mg/L TDZ (kí hiệu NM1, NM2, NM3, tương ứng) được cấy sang môi trường MS bổ sung 0,3 mg/L α -naphthaleneacetic acid (NAA) (Huang, 1988) trong 1 tháng để tạo cây con hoàn chỉnh. Sau đó, các cây lan Kim Hải 1 tháng tuổi, có từ 4 - 5 lá, 3 - 6 rễ, rễ được rửa sạch agar và sau đó đem trồng trên giá thể dớn Đài Loan tại Vườn ươm của Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, che sáng 50%. Trong 2 tuần đầu sau khi trồng, cây được tưới phun sương ngày 4 lần, sau đó tưới 2 lần/ngày; phun thuốc trừ sâu, thuốc nấm 1 - 2 lần/tuần; bón phân NPK (16:16:8) (20 g/L) 1 lần/tuần.

Điều kiện thí nghiệm

Điều kiện *in vitro*: Nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, thời gian chiếu sáng 16 h/ngày, dưới ánh sáng đèn huỳnh quang với cường độ chiếu sáng $40 - 45 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ và độ ẩm phòng nuôi là 55 - 60%.

Điều kiện *ex vitro*: Nhiệt độ khoảng $15 - 28^\circ\text{C}$, độ ẩm trung bình khoảng 75 - 80%, sử dụng ánh sáng tự nhiên và che sáng 50%.

Chỉ tiêu theo dõi

Giai đoạn tái sinh chồi: Tỷ lệ tái sinh chồi (%), số chồi/đốt thân, chiều cao chồi (cm) được ghi nhận sau 3 tháng nuôi cấy.

Hệ số nhân chồi: Tỷ lệ nhân chồi (%), số chồi/đốt thân.

Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh: Số rễ/chồi, chiều dài rễ (cm), số lá mới hình thành, khối lượng tươi (g), khối lượng khô (g), giá trị SPAD được ghi nhận sau 1 tháng.

Xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên và được lặp lại 3 lần, các số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và phần mềm phân tích thống kê SPSS 16.0 theo phương pháp Duncan với $\alpha = 0,05$ (Duncan, 1955).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khả năng kéo dài chồi lan Kim Hải *in vitro* trong điều kiện chiếu sáng khác nhau

Sau 3 tháng nuôi cấy, kết quả ghi nhận được cho thấy chồi non lan Kim Hải *in vitro* (1,5 cm) đặt trong điều kiện che tối hoàn toàn có chiều cao trung bình đạt 5,25 cm với 3,00 đốt/chồi rõ rệt (Bảng 1, Hình

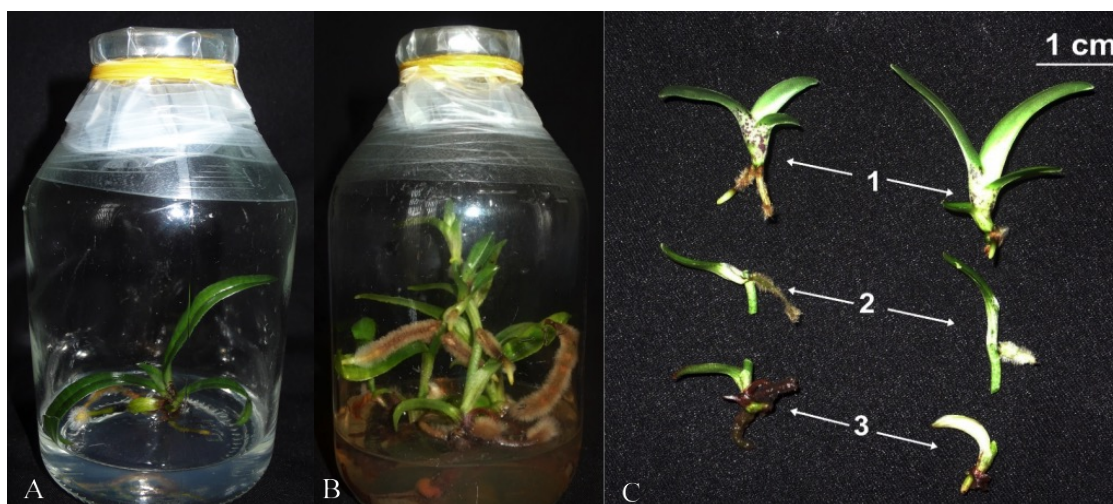
2B); trong khi đó, ở điều kiện sáng chiếu cao chồi chỉ đạt 2,45 cm và không có sự phân đốt rõ rệt (Bảng 1, Hình 2A).

Sau 1 tháng nuôi cấy chồi lan Kim Hải *in vitro* chưa phân đốt, sau 2 tháng bắt đầu phân đốt nhưng chưa rõ rệt chiều dài các đốt còn ngắn và sau 3 tháng các chồi có sự phân đốt rõ rệt. Vì vậy, trong nghiên cứu này 3 tháng là khoảng thời gian tối ưu nhất. Vũ Quốc Luận và đồng tác giả (2012) đã nghiên cứu sự kéo dài chồi *ex vitro* lan Hải Hồng trong điều kiện chiếu LED và trong tối, kết quả thu được chồi kéo dài tốt nhất trong điều kiện tối sau 4 tháng với chiều cao trung bình đạt (8,87 cm). Điều kiện trong tối giúp tăng cường khả năng sản sinh các GA₃ nội sinh dẫn đến kích thích khả năng kéo dài chồi (John *et al.*, 1992). Như vậy, việc kéo dài chồi *in vitro* và độ dài lóng thân trong điều kiện tối rất có ý nghĩa trong vi nhân giống, phương pháp này có thể tạo ra nhiều đốt thân phục vụ nghiên cứu tái sinh và nhân giống. Những chồi phân đốt được cắt thành từng đốt rồi sử dụng làm vật liệu cho quá trình tái sinh chồi (Hình 2C).

Bảng 1. Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng khác nhau lên sự kéo dài chồi lan Kim Hải *in vitro*.

Điều kiện chiếu sáng	Chiều cao chồi (cm)	Số lá mới hình thành	Số đốt/chồi	Hình thái chồi
Sáng	2,45 ± 0,20*	4,32 ± 0,15	1,00 ± 0,22	Chồi mập, lá xanh đậm
Tối	5,25 ± 0,35	3,75 ± 0,21	3,00 ± 0,30	Chồi dài, lá non hình thành có màu xanh trắng, lá gốc có màu nâu

Chú thích: *Mỗi cột thể hiện trị số trung bình với sai số chuẩn ± SE (n=3).



Hình 2. Sự kéo dài đốt thân của chồi lan Kim Hải *in vitro* sau 3 tháng. A. Chồi lan Kim Hải *in vitro* được đặt ở điều kiện sáng, B. Chồi lan Kim Hải *in vitro* được đặt ở điều kiện tối, C. Chồi được cắt thành từng đốt riêng biệt với 3 vị trí đốt thân (từ trên đỉnh chồi xuống): 1, 2, 3.

Ảnh hưởng của BA lên sự tái sinh chồi từ đốt thân lan Kim Hải

Sự có mặt của BA trong môi trường nuôi cấy kích thích sự hình thành chồi bên lan Kim Hải. Khi bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau vào môi trường nuôi cấy cho thấy tỷ lệ tái sinh chồi, số chồi có sự khác biệt rõ rệt sau 3 tháng nuôi cấy. Chiều cao chồi không có khác biệt lớn giữa các nghiệm thức sau 3 tháng nuôi cấy. Khi tăng nồng độ BA từ 0,0 - 1,0 mg/L thì tỷ lệ tái sinh chồi và số chồi tăng lên và đạt tối ưu ở nồng độ 1,0 mg/L với tỷ lệ tái sinh chồi (52,78%), số chồi (3,2 chồi/đốt thân) (Bảng 2). Hình thái của chồi lan Kim Hải trên môi trường này có lá xanh đậm, dài và chồi to (Hình 3A). Tuy nhiên, khi nồng độ BA tăng cao hơn 1,0 mg/L sự tái sinh chồi lan Kim Hải có xu hướng giảm dần thể hiện qua tỷ lệ tái sinh chồi và số chồi giảm. Chiều

cao chồi không có sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức (Bảng 2).

Nghiên cứu của Patcharawadee và đồng tác giả (2011) trên đối tượng lan Vân Hải (*Paphiopedilum callosum*) chỉ ra rằng ở nồng độ 50 μ M (1,0 mg/L) BA số chồi đạt cao nhất (2,2 chồi/đốt thân), khi nồng độ BA từ 10 - 50 μ M thì khả năng tái sinh chồi tăng nhưng ở nồng độ 100 μ M (2 mg/L) BA cao thì lại ức chế sự tái sinh chồi. Kết quả trong nghiên cứu này cũng tương tự với nghiên cứu của Bo Long và đồng tác giả (2010) trên đối tượng *Paphiopedilum var. densissimum*, *P. insigne*, *P. bellatulum* và *P. armeniacum*, khi nồng độ BA tăng thì số chồi hình thành giảm dần. Như vậy, chồi lan Kim Hải có nguồn gốc từ nuôi cấy đốt thân được nuôi cấy trên môi trường SH bổ sung 1,0 mg/L BA cho sự tái sinh chồi tốt nhất.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BA lên sự tái sinh chồi từ các đốt thân của lan Kim Hải sau 3 tháng nuôi cấy.

BA (mg/L)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/đốt thân	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái chồi
0,0	5,56 ^{d*}	0,7 ^c	3,20 ^a	Chồi to, lá xanh đậm
0,5	27,22 ^b	1,1 ^{bc}	3,17 ^a	Chồi to, lá xanh đậm
1,0	52,78 ^a	3,2 ^a	3,15 ^{ab}	Chồi to, lá xanh đậm
1,5	28,33 ^b	1,6 ^b	3,14 ^{ab}	Chồi to, lá xanh đậm
2,0	13,89 ^c	0,9 ^c	3,18 ^a	Chồi to, lá xanh đậm

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

Ảnh hưởng của KIN lên sự tái sinh chồi từ đốt thân lan Kim Hải

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, KIN ảnh hưởng đến tỷ lệ tái sinh chồi và số chồi một cách rõ rệt. Sự tái sinh chồi tăng dần khi tăng nồng độ KIN từ 0,5 - 1,0 mg/L, đạt tối ưu ở nồng độ 1,0 mg/L KIN với tỷ lệ tái sinh chồi đạt 31,67% và số chồi đạt 3,7 chồi/đốt thân và có hình thái chồi với lá xanh tốt, thân mập sau 3 tháng nuôi cấy (Bảng 3, Hình 3B). Tăng nồng độ KIN lên đến 2,0 mg/L thì khả năng tái sinh chồi (1,7%) và số chồi (0,3 chồi/đốt thân) giảm (Bảng 3). Chiều cao chồi không có sự khác biệt rõ rệt so với nghiệm thức khác. Kết quả nghiên cứu này cho thấy

việc bổ sung nồng độ KIN quá cao vào môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến sự nhân chồi lan Kim Hải.

Tương tự như BA, KIN cũng có khả năng kích thích sự sinh trưởng chồi lan Kim Hải. Pou-leng Hong và đồng tác giả (2008) nghiên cứu trên đối tượng lan Hải (*P. Alma Gavaert*) cho thấy sự sinh trưởng và phát triển của chồi tốt nhất trên môi trường bổ sung 1,0 mg/L KIN và giảm dần khi nồng độ tăng lên 4 mg/L. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với nghiên cứu của Pou-leng Hong và đồng tác giả (2008). Như vậy, mẫu cấy có nguồn gốc từ đốt thân được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 1,0 mg/L KIN là thích hợp cho sự tái sinh chồi lan Kim Hải.

Bảng 3. Ảnh hưởng của KIN lên sự tái sinh chồi từ đốt thân của chồi lan Kim Hải sau 3 tháng nuôi cấy.

KIN (mg/L)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/đốt thân	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái chồi
0,0	5,56 ^{d*}	0,7 ^c	3,09 ^a	Chồi to, lá xanh đậm
0,5	16,67 ^c	1,6 ^b	3,01 ^a	Chồi to, lá xanh đậm
1,0	31,67 ^a	3,7 ^a	2,98 ^{ab}	Chồi nhỏ, lá xanh nhạt
1,5	22,22 ^b	2,6 ^b	3,11 ^a	Chồi to, lá xanh đậm
2,0	1,67 ^d	0,3 ^d	3,13 ^a	Chồi to, lá xanh đậm

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

Ảnh hưởng của TDZ lên sự tái sinh chồi từ đốt thân lan Kim Hải

Đối với thí nghiệm bổ sung TDZ sau 3 tháng nuôi cấy, khả năng tái sinh chồi từ đốt thân lan Kim Hải tốt nhất trên môi trường bổ sung 0,5 mg/L TDZ thể hiện ở các chỉ tiêu tỷ lệ tái sinh chồi (85%) và số chồi (6,6 chồi/đốt thân) (Bảng 4). Về hình thái chồi, các chồi được nuôi cấy trên môi trường bổ sung 0,5 mg/L TDZ cũng cho chồi nhỏ, lá xanh tốt và thân mập (Hình 3C).

Ngoài BA và KIN, TDZ cũng có khả năng kích thích sự sinh trưởng chồi ở các loài thực vật nuôi cấy

mô (Chen, Piluek, 1995; Nayak *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2002). Nghiên cứu của Dương Tấn Nhựt và đồng tác giả (2005) chỉ ra rằng nồng độ TDZ cao hơn 0,6 mg/L đã gây ra hiện tượng ức chế sự sinh trưởng và phát triển của cây lan Hải Hồng. Trong nghiên cứu này, khi tăng nồng độ TDZ lên đến 1,0 mg/L thì chỉ tiêu số chồi giảm dần (Bảng 4). Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của Huang và đồng tác giả (2001) cho rằng TDZ ức chế nhân nhanh chồi trên đối tượng lan Hải (*Paphiopedilum* sp.). Do đó, mẫu cấy có nguồn gốc từ đốt thân được nuôi cấy trên môi trường bổ sung 0,5 mg/L TDZ thích hợp nhất cho sự tái sinh chồi lan Kim Hải.



Hình 3. Sự tái sinh chồi từ đốt thân của chồi lan Kim Hải sau 3 tháng nuôi cấy trên môi trường bổ sung các nồng độ cytokine khác nhau. A. Nồng độ BA: 0,0; 0,5 ; 1,0 ; 1,5 ; 2,0 mg/L (từ trái qua phải); B. Nồng độ KIN: 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L (từ trái qua phải); C. Nồng độ TDZ: 0,0; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0 mg/L (từ trái qua phải).

Bảng 4. Ảnh hưởng của TDZ lên sự tái sinh chồi từ đốt thân của chồi lan Kim Hải sau 3 tháng nuôi cấy.

TDZ (mg/L)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/đốt thân	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái chồi
0,0	5,56 ^{a*}	0,7 ^c	3,11 ^a	Chồi cao, lá xanh đậm
0,3	45,00 ^b	1,7 ^b	3,04 ^a	Chồi cao, lá xanh đậm
0,5	85,00 ^a	6,6 ^a	3,00 ^a	Chồi nhỏ, lá xanh đậm, thân mập
1,0	32,22 ^c	1,6 ^b	3,03 ^a	Chồi to, lá xanh đậm
1,5	17,22 ^d	0,8 ^c	3,05 ^a	Chồi nhỏ

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

Kết quả trình bày trong bảng 5 cho thấy hệ số nhân chồi có sự khác biệt rõ rệt giữa 3 chất BA, KIN, TDZ và đối chứng. TDZ ảnh hưởng tốt lên hệ số nhân chồi *in vitro*. Mẫu cấy từ đốt thân trên môi trường SH bổ sung 0,5 mg/L TDZ được ghi nhận tỷ lệ tái sinh chồi đạt 85% và hệ số nhân chồi đạt 5,6 chồi/đốt thân. Trong khi đó mẫu đối chứng là những chồi lan Kim Hải tỷ lệ tái sinh chồi 100% nhưng hệ số nhân chồi chỉ đạt 3,4 chồi/đốt thân thấp hơn so với mẫu cấy có nguồn gốc từ đốt thân (Bảng 5). Điều này cũng có thể giải thích rằng trong nhóm cytokinin, TDZ có hoạt tính sinh học cao hơn so với BA và KIN, do đó chỉ cần bổ sung vào môi trường nuôi cấy một lượng rất thấp là có khả năng kích thích tạo chồi. Mặt khác, TDZ chống lại được sự phân hủy gây ra bởi tác nhân oxy hóa cytokinin, ngăn cản quá trình oxy hóa làm giảm lão hóa và hóa nâu của mẫu cấy; hơn nữa, TDZ bền vững trong môi trường nuôi cấy (Mok *et al.*, 1982).

Mẫu cấy từ chồi lan Kim Hải khi được nuôi cấy trên môi trường bổ sung 0,5 mg/L TDZ cho khả năng tái sinh chồi không cao do chồi ngọn chứa mô phân sinh đỉnh, auxin từ chồi ngọn sẽ ức chế sự tái sinh chồi bên, bên cạnh đó, ưu thế chồi

ngọn được điều khiển bởi sự cân bằng giữa nồng độ cytokinin và auxin nội sinh. Còn mẫu cấy từ đốt thân lan Kim Hải đã được loại bỏ chồi ngọn do đó làm thay đổi cân bằng auxin của chồi ngủ ở đốt thân, TDZ trong môi trường nuôi cấy làm phá vỡ trạng thái ngủ kích thích sự tái sinh chồi bên (Hoàng Đức Cự, 2006).

Năm 2005, Nhut và đồng tác giả đã sử dụng phương pháp gây vết thương kết hợp với môi trường lỏng có bổ sung TDZ và NAA đã làm tăng hệ số nhân lên một cách đáng kể là 5,2 chồi/mẫu. Luan và đồng tác giả (2012) cũng sử dụng phương pháp cắt đốt cho các chồi *ex vitro* lan Hải Hồng phục vụ cho quá trình tái sinh *in vitro* với tỷ lệ đạt 33,50%, phương pháp cắt hom và kết hợp xử lý phân bón lá để kích thích tạo chồi bên trên đối tượng lan Mokara đã được báo cáo bởi Dương Hoa Xô (2007) với kết quả thu được 4,5 - 5 chồi/cây. Cùng thời gian 3 tháng nhân chồi, kết quả sử dụng nuôi cấy đốt thân cho tỷ lệ tái sinh chồi và hệ số nhân chồi cao hơn so với các phương pháp trước đây. Như vậy, nghiên cứu này đã chứng minh được hiệu quả của việc nhân chồi sử dụng nuôi cấy đốt thân *in vitro* trên môi trường SH bổ sung 0,5 mg/L TDZ.

Bảng 5. Hệ số nhân chồi lan Kim Hải của BA, KIN và TDZ.

Nồng độ CĐHST	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/đốt thân	Hệ số nhân chồi
ĐC	100 ^{a*}	3,4 ^c	3,40 ^b
1,0 mg/L BA	52,78 ^c	3,2 ^c	1,7 ^c
1,0 mg/L KIN	31,67 ^d	3,7 ^b	1,2 ^c
0,5 mg/L TDZ	85,00 ^b	6,6 ^a	5,6 ^a

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

Khả năng tạo cây lan Kim Hải hoàn chỉnh

Khả năng tạo cây hoàn chỉnh của chồi đơn lan Kim Hải có nguồn gốc từ đốt thân nuôi cấy trên NM1, NM2, NM3 (Hình 4A) cấy sang môi trường MS bổ sung 0,3 mg/L NAA sau 1 tháng được thể

hiện qua các chỉ tiêu số rễ, chiều dài rễ, số lá, khối lượng tươi, khối lượng khô và giá trị SPAD trong Bảng 6. Kết quả cho thấy 100% chồi đều tái sinh rễ. Sau 1 tháng nuôi cấy chồi lan Kim Hải từ NM3 khi cấy vào môi trường MS bổ sung 0,3 mg/L NAA

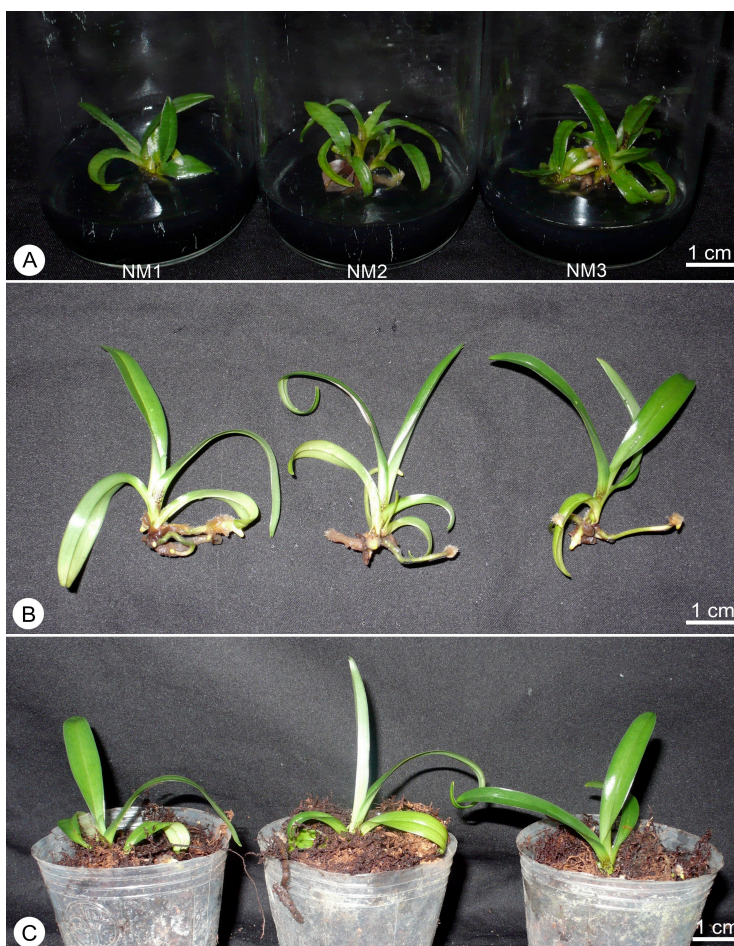
được ghi nhận chồi ra rễ tốt nhất với 6,6 rễ/chồi, số lá (6,78 lá/chồi), khối lượng tươi (1,92 g), khối lượng khô (0,15 g), giá trị SPAD (40,50), hình thái

chồi (thân to, lá xanh đậm, rễ dài) tốt hơn so với chồi lan Kim Hải từ môi trường bổ sung 1,0 mg/L BA và 1,0 mg/L KIN (Bảng 6, Hình 4B).

Bảng 6. Khả năng tạo cây lan Kim Hải hoàn chỉnh sau 1 tháng nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 0,3 mg/l NAA.

Nguồn mẫu	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)	Số lá	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Giá trị SPAD	Hình thái chồi
NM1	5,5 ^{b*}	2,87 ^b	5,17 ^b	1,56 ^b	0,10 ^b	35,73 ^b	Chồi yếu, xanh nhạt
NM2	3,3 ^c	2,25 ^c	4,55 ^c	1,33 ^c	0,09 ^{bc}	32,32 ^c	Chồi to, xanh nhạt
NM3	6,6 ^a	2,17 ^a	6,78 ^a	1,92 ^a	0,15 ^a	40,50 ^a	Chồi to, xanh đậm

Chú thích: *Những chữ cái khác nhau (a, b, c, ...) được nêu trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong phép thử Duncan. NM1: Chồi từ MT bổ sung 1,0 mg/L BA; NM2: Chồi từ MT bổ sung 1,0 mg/L KIN; NM3: Chồi từ MT bổ sung 0,5 mg/L TDZ.



Hình 4. Tạo cây hoàn chỉnh từ nuôi cấy đốt thân của chồi lan Kim Hải. A. Nguồn mẫu: NM1: Chồi từ MT bổ sung 1,0 mg/L BA; NM2: Chồi từ MT bổ sung 1,0 mg/L KIN; NM3: Chồi từ MT bổ sung 0,5 mg/L TDZ (từ trái qua phải); B. Sự hình thành rễ của các chồi lan Kim Hải từ NM3 trên môi trường MS bổ sung 0,3 mg/L NAA. C. Chồi sinh trưởng và phát triển ngoài vườn ươm sau 3 tháng.

KẾT LUẬN

Chồi lan Kim Hải *in vitro* sinh trưởng trong điều kiện tối cho sự kéo dài chồi tốt nhất (5,25 cm) và tạo ra số đốt trung bình cao nhất (3,00 đốt/chồi). Chồi có nguồn gốc từ nuôi cấy đốt thân trên môi trường SH bổ sung 0,5 mg/L TDZ, 30 g/L sucrose, 8 g/L agar và 1 g/L than hoạt tính cho tỷ lệ tái sinh chồi tốt nhất (85%) và hiệu quả nhân chồi cao nhất (6,6 chồi/đốt thân). Sau đó các chồi lan Kim Hải này được tách ra thành chồi đơn để tạo cây hoàn chỉnh cho sự tái sinh rễ cao nhất (6,6 rễ/chồi) sau 1 tháng. Cây con lan Kim Hải *in vitro* khỏe mạnh được trồng trên giá thể dớn Đài Loan cho tỷ lệ sống sót cao đạt 100%. Như vậy, phương pháp sử dụng nuôi cấy đốt thân để nhân chồi được thực hiện tương đối đơn giản nhưng cho hệ số nhân giống cao hơn so với các phương pháp nhân giống khác.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin chân thành cảm ơn Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (Nafosted) đã tài trợ kinh phí cho đề tài “Nghiên cứu một số kỹ thuật mới trong vi nhân giống và chọn tạo giống lan Hải (*Paphiopedilum* spp.) - mã số: 106-NN.01-2015.02” và tạo điều kiện cho chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arditti J, Ernst R (1993) *Several early scientific investigators and their research: A contribution towards the history of orchids in the United States of America*, Rittershausen W ed. 100 years of orchids, the Orchid Review centenary year book 1893-1993. Bradfield Books, Creat Bardfield, Braintree, Essex CM7 4RZ, UK: 125–142.
- Chen Y, Piluek C (1995) Effects of thidiazuron and N⁶-benzylaminopurine on shoot regeneration of *Phalaenopsis*. *Plant Growth Regul* 16: 99–101.
- Chen TY, Chen JT, Chang WC (2002) Multiple shoot formation and plant regeneration from stem nodal explants of *Paphiopedilum* orchids. *In Vitro Plant* 38: 595–597.
- Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (2008) *Appendices I, II and III*. Geneva, Switzerland. Available at: <http://www.cites.org/eng/app/E-Jul01.pdf>
- Chyuam YN, Saleh NM, Zaman FQ (2010) *In vitro* multiplication of the rare and endangered slipper orchid, *Paphiopedilum rothschildianum* (Orchidaceae). *Afr J Biotechnol* 9(14): 2062–2068.
- Duncan DB (1955) Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11: 1–42.
- Dương Hoa Xô (2007) Ứng dụng một số tiến bộ kỹ thuật mới trong việc nhân giống và cải thiện chất lượng cành hoa nhóm hoa lan cắt cành Mokara. Hội nghị khoa học Công nghệ sinh học thực vật trong công tác nhân giống và chọn tạo giống hoa. *NXB. Nông nghiệp*: 341–347.
- John JR, Christine LW, Paul G, James BR (1992) Shoot elongation in *Lathyrus odoratus* L.: Gibbrellin levels in light- and dark-grown tall and dwarf seedlings. *Planta* 187: 10–13.
- Hoàng Đức Cự (2006) *Sinh học thực vật*. NXB. Đại học Quốc Gia Hà Nội.
- Hong PI, Chen JT, Chang WC (2008) Plant regeneration via protocorm-like body formation and shoot multiplication from seed derived callus of a *Maudia* type slipper orchid. *Acta Physiol Plant* 30: 755–759.
- Huang LC (1988) A procedure for asexual multiplication of *Paphiopedilum in vitro*. *Am Orchid Soc Bul* 57: 274–278.
- Huang LC, Lin CJ, Kuo CI, Huang BL, Murashige T (2001) *Paphiopedilum* cloning *in vitro*. *Sci Hort* 91: 111–121.
- Knudson C (1946) A nutrient for germination of orchids. *Am Orchid Soc Bull* 15: 214–217.
- Long B, Niemiera AX, Cheng Z, Long C (2010) *In vitro* propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae). *Plant Cell Tiss Org Cult* 101: 151–162.
- Mok MC, Mok DWS, Armstrong DJ, Shudo K, Isogai Y, Okamoto T (1982) Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-yl urea. *Phytochemistry* 21: 1509–1511.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiol Plant* 15: 473–496.
- Nayak NR, Rath SP, Patnaik S (1997) *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (BuchHam) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation. *Sci Hort* 71: 243–250.
- Nhut DT, Trang PTT, Vu NH, Thuy DTT, Khiem DV, Tran Thanh Van K (2005) A wounding method and liquid culture in *Paphiopedilum delenatii* propagation. *Prop Orn Plant* 5(3): 158–163.
- 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.
- Patcharawadee W, Eric B, Kongkanda C, Sureeya T (2011) Effect of cytokinin (BA and TDZ) and auxin (2,4-D) on growth and development of *Paphiopedilum callosum*. *Kasetsart J Nat Sci* 45: 12–19.

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.

Stewart J, Button J (1975) Tissue culture studies in *Paphiopedilum*. *Amer Orc Soc Bull* 44: 591–599.

Trần Thị Bích Hạnh, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Bá Nam, Lê Kim Cương, Nguyễn Phúc Huy, Dương Tấn Nhựt (2013) Ảnh hưởng của BA, KIN, TDZ, GA₃ và mật độ mẫu cấy lên sự sinh trưởng và phát triển của chồi lan Kim Hải (*Paphiopedilum villosum*) nuôi cấy *in vitro*. *Hội Nghị Khoa học Công nghệ Sinh học toàn quốc*: 797–801.

Vũ Quốc Luận, Nguyễn Phúc Huy, Lê Thị Thanh Trà, Đỗ Khắc Thịnh, Dương Tấn Nhựt (2012) Nghiên cứu sự kéo dài chồi *ex vitro* dưới ánh sáng đơn sắc (LED) phục vụ cho nghiên cứu tái sinh và nhân giống cây lan Hải Hồng (*Paphiopedilum delenatii*). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 10(4A): 961–968.

Vũ Quốc Luận, Nguyễn Phúc Huy, Đỗ Khắc Thịnh, Dương Tấn Nhựt (2014) Sử dụng phương pháp cắt đốt và trồng trực tiếp ra vườn ươm cây lan Hải Hồng (*Paphiopedilum delenatii*). *Tạp chí Sinh học* 35(1se): 272–276.

SHOOT MULTIPLICATION VIA ELONGATED STEM NODE CULTURE UNDER DARKNESS: A NOVEL METHOD IN MICROPROPAGATION OF *PAPHIOPEDILUM VILLOSUM*

Nguyen Phuc Huy, Dang Thi Tinh, Vu Quoc Luan, Hoang Thanh Tung, Vu Thi Hien, Duong Tan Nhut

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

SUMMARY

Paphiopedilum villosum is a beautiful orchid species and has high value in trade; however, this is one of the most difficult to propagate orchids. So far, there has been very little publication on micropropagation. In this study, the effects of plant growth regulators on shoot regeneration from stem node culture of elongated *P. villosum* shoots in the darkness were investigated. Shoots (1.5 cm) were elongated and produced individual stem nodes under darkness condition for 3 months. Stem nodes were cultured on SH medium and supplemented with individually BA, KIN or TDZ to investigate shoot regeneration. The shoot multiplication rate was also recorded in this study. The highest stem node was observed in the dark with 5.25 cm in the height and the number of stem nodes were 3 stem nodes/shoot. The isolated stem node was cultured on SH medium supplemented with 30 g/L sucrose, 8 g/L agar, 1 g/L charcoal and different concentrations of BA, KIN, TDZ. The results observed after 3 months showed that the best shoot regeneration rate (85%) and highest shoot multiplication coefficient (6.6 shoots/stem node) was obtained when shoots derived from stem node were cultured on SH medium supplemented with 0.5 mg/L TDZ, 30 g/L sucrose, 8 g/L agar and 1 g/L charcoal. Those shoots obtained in the above treatments were subcultured on MS medium supplemented with 0.3 mg/L NAA for rooting and gave the highest number of roots (6.6 roots/shoot) after 1 month; and these plantlets were acclimatized in Taiwan sphagnum moss and transferred into greenhouse with the best survival rate (100%) after 3 months.

Keywords: *In vitro* propagation, *Paphiopedilum villosum*, shoot elongation, stem node culture