

THE EVALUATION OF THE POLLEN'S FERTILIZATION ABILITY AND THE EXTERNAL MORPHOLOGICAL CHANGES OF *IN VITRO* HYBRID ORCHID PLANTLETS

Vu Quoc Luan^{1*}, Pham Thi Kim Linh¹, Ta Dinh Vuong¹, Do Manh Cuong¹, Nguyen Thi Nhu Mai¹, Hoang Hai Dang¹, Phan Xuan Huyen¹, Nguyen Van Binh², Hoang Thanh Tung², Nguyen Ba Nam², Le Van Thuc³, Pham Thi Thanh Van³, Pham Ngoc Duy³, Nguyen Ngoc Son⁴, Duong Tan Nhut¹

¹Institute of Life Science, VAST, Dalat, ²Dalat University, ³Dalat Nuclear Research Institute, ⁴Dalat College

ARTICLE INFO		ABSTRACT
Received:	13/3/2025	Plant breeding is an effective method for generating hybrid plants with intermediate or distinct morphological traits compared to their parental species. In hybridization, pollen and ovary quality are crucial for capsule formation and seed development. In this study, artificial and cross-pollination were performed between two species, <i>P. appletonianum</i> and <i>P. delenatii</i> , on flowers that bloomed after 3, 4, 5, 6, and 7 days. The highest artificial fruit-setting rates were 36.66% for <i>P. delenatii</i> , 66.66% for <i>P. appletonianum</i> , and 26.66% for the crossbred plantlet (<i>P. appletonianum</i>). The highest seed germination rate was observed in the ½SH medium, with a rate of 60.33% for crossbred seeds, 75.00% for <i>P. delenatii</i> , and 84.66% for <i>P. appletonianum</i> . <i>In vitro</i> growth of the hybrid plantlets showed reduced leaf length and fresh weight compared to the parents. However, the leaf width of the hybrid was intermediate between the parent species. Morphologically, hybrid leaves were shorter and elliptical, with white spots on the upper surface and light purple spots on the lower surface-distinct hybridization markers. Chromosomal analysis of the hybrid revealed a chromosome count of $2n = 32$, intermediate between the maternal species (<i>P. appletonianum</i> , $2n = 38$) and paternal species (<i>P. delenatii</i> , $2n = 26$).
Revised:	12/6/2025	
Published:	12/6/2025	
KEYWORDS		
Chromosome		
Hybrid plants		
Paphiopedilum		
Germination		
Pollination		

ĐÁNH GIÁ ĐỘ HỮU THỤ CỦA HẠT PHẤN VÀ NHỮNG THAY ĐỔI HÌNH THÁI BÊN NGOÀI CỦA CÂY CON LAI LAN HẢI TRONG NUÔI CÂY *IN VITRO*

Vũ Quốc Luận^{1*}, Phạm Thị Kim Linh¹, Tạ Đình Vương¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Nguyễn Thị Như Mai¹, Hoàng Hải Đăng¹, Phan Xuân Huyền¹, Nguyễn Văn Bình², Hoàng Thanh Tùng², Nguyễn Bá Nam², Lê Văn Thúc³, Phạm Thị Thanh Vân³, Phạm Ngọc Duy³, Nguyễn Ngọc Sơn⁴, Dương Tấn Nhựt¹

¹Viện Khoa học Sự sống - VAST, Đà Lạt, ²Trường Đại học Đà Lạt

³Viện Nghiên cứu hạt nhân Đà Lạt, ⁴Trường Cao đẳng Đà Lạt

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 13/3/2025	Lai tạo giống là một trong những phương pháp hữu hiệu nhằm tạo ra các cây con lai mang những đặc điểm về hình thái trung gian hoặc khác biệt hoàn toàn so với cây bố mẹ. Trong quá trình lai giống, chất lượng hạt phấn và bầu nhụy quyết định đến khả năng đậu trái và phát triển của hạt trong tương lai. Trong nghiên cứu này, các bông hoa nở sau 3, 4, 5, 6 và 7 ngày được tiến hành thụ phấn nhân tạo và thụ phấn chéo giữa hai loài Hải Táo và Hải Hồng. Tỷ lệ đậu trái nhân tạo cao nhất đạt 36,66% (Hải Hồng), 66,66% (Hải Táo) và cây lai chéo đạt 26,66% (Hải Táo). Hạt lan này mầm cao nhất trên môi trường ½SH với tỉ lệ 60,33% (hạt lai), 75,00% (Hải Hồng) và 84,66% (Hải Táo). Cây con lai sinh trưởng và phát triển thấp hơn so với cây bố mẹ về chiều dài lá, khối lượng tươi. Chiều rộng lá là sự kết hợp trung gian giữa cây bố và cây mẹ. Lá của cây con lai có sự thay đổi về hình dạng với lá ngắn và có hình elip với những đốm lớn màu trắng nằm ở mặt trên và những đốm màu tím lợt nằm ở mặt dưới lá. Cây con lai có bộ nhiễm sắc thể là $2n = 32$, bộ nhiễm sắc thể của cây mẹ (Hải Táo, $2n = 38$) và cây bố (Hải Hồng, $2n = 26$).
Ngày hoàn thiện: 12/6/2025	
Ngày đăng: 12/6/2025	
TỪ KHÓA	
Bộ nhiễm sắc thể	
Cây con lai	
Lan Hải	
Nảy mầm	
Thụ phấn	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.12303>

* Corresponding author. Email: vuquocluan07@gmail.com

1. Giới thiệu

Hoa lan luôn được mệnh danh là nữ hoàng của các loài hoa bởi chúng hội tụ nhiều yếu tố với nét đẹp kiêu kỳ, thanh tao, hương thơm, lâu tàn và sự đa dạng về chủng loại. Hoa lan với khoảng 20.000 - 30.000 loài và là họ lớn nhất trong số các loài thực vật có hoa. Cho đến nay, người ta đã thu được các giống con lai trong cùng loài hoặc giữa các chi thuộc họ lan. Khoảng 125.000 giống lai đã được đăng ký với khoảng 15.000 giống mỗi năm [1]. Lai tạo giống cây trồng là một trong những phương pháp hữu hiệu nhằm tạo ra các cây con lai với những đặc điểm về hình thái trung gian hoặc khác biệt hoàn toàn so với cây bố mẹ. Tại Việt Nam, hiện nay đã xác định được 8 con lai tự nhiên giữa các loài thuộc chi lan Hải [2]. Trong quá trình lai tạo giống, chất lượng của hạt phấn và bầu nhụy là yếu tố quyết định đến khả năng đậu trái cao hay thấp cũng như sự phát triển tiếp theo của hạt trong tương lai. Những yếu tố chính ảnh hưởng tới quá trình thụ phấn như thời điểm hoa nở, nhiệt độ, độ ẩm và đặc tính của giống. Trong đó, độ thành thực của hạt phấn đối với cây cho hoa nở dài ngày cần được khảo sát tỉ mỉ để tìm ra thời điểm thích hợp cho khả năng thụ phấn đạt kết quả cao nhất. Chang và Esther [3] đã tiến hành khảo sát ảnh hưởng của số ngày hoa nở lên khả năng đậu trái trên giống hành Tây (*Allium cepa* L), kết quả cho thấy, sau 3 ngày nở hoa cho tỉ lệ đậu trái cao nhất. Độ hữu thụ của hạt phấn ở một số thời điểm nở hoa trong ngày cũng được khảo sát. Giống Khổ qua địa phương có độ hữu thụ hạt phấn cao nhất lúc 8 giờ 30 sáng và giống thương mại cho độ hữu thụ cao nhất lúc 11 giờ trưa [4]. Tỉ lệ đậu trái trên các giống lan Hồ Điệp cũng bị ảnh hưởng theo mùa trong năm, mùa đông cho tỉ lệ đậu trái cao nhất và mùa hè cho tỉ lệ đậu trái thấp [5]. Các loài lan đặc hữu, có vùng phân bố hẹp, thường bị cô lập về mặt sinh sản, bao gồm (sự khác biệt về mặt di truyền, thời gian nở hoa, vật trung gian thụ phấn hoa...). Cho đến nay, đã có một số công trình nghiên cứu về ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy, độ tuổi của hạt, điều kiện chiếu sáng... lên khả năng nảy mầm của hạt lan Hải trong nuôi cấy *in vitro*. Kết quả cho thấy, khi sử dụng các môi trường nuôi cấy có hàm lượng muối khoáng thấp thường cho tỉ lệ nảy mầm của hạt lan Hải cao hơn [6], [7]. Tỉ lệ nảy mầm của hạt lan Hải thường bị ức chế trên môi trường có hàm lượng muối khoáng cao như MS [6], [8]. Trong khi đó, tỉ lệ nảy mầm của hạt còn phụ thuộc vào độ tuổi khi tiến hành gieo. Khả năng nảy mầm cao nhất khi trái đạt từ 180 - 200 ngày tuổi và sau đó tỉ lệ nảy mầm sẽ giảm dần [7]. Tiền xử lý hạt sau khi gieo trong điều kiện che tối (45 - 60 ngày), sau đó chuyển sang điều kiện chiếu sáng sẽ cho tỉ lệ nảy mầm cao hơn so với trong điều kiện chiếu sáng hoàn toàn [7], [8]. Đối với các loài lan Hải lai, đặc hữu và có vùng phân bố hẹp như loài lan Hải (*Paphiopedilum lowii*), loài lan Hải Đuối (*Paphiopedilum liemianum*) và loài lan Hải Kim cho tỉ lệ nảy mầm *in vitro* thường rất thấp [6], [9], [10]. Hoa lan Hải có thời gian hoa nở lâu tàn từ 10 - 30 ngày, do đó, cần được tiến hành khảo sát thời điểm thích hợp cho tỉ lệ hữu thụ cao nhất theo từng loài và kết hợp thụ phấn chéo nhằm thu được các tổ hợp con lai nhiều nhất. Mục tiêu của nghiên cứu này là tìm ra thời điểm phù hợp cho khả năng đậu trái khi tiến hành tự thụ phấn và thụ phấn chéo giữa hai loài lan Hải đạt kết quả cao nhất. Các trái lan sau khi thụ phấn cần tiến hành khảo sát tỉ mỉ các yếu tố ảnh hưởng lên quá trình nảy mầm của hạt nhằm thu được số lượng cây con nhiều nhất để tiến hành đánh giá khả năng sinh trưởng, phát triển và những thay đổi về mặt hình thái bên ngoài của cặp con lai so với cây bố mẹ trong nuôi cấy *in vitro*. Kết quả của nghiên cứu này là tiền đề để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo trong công tác chọn tạo giống lan Hải nhằm bảo tồn và phát triển các nguồn gene quý, đồng thời tạo ra các giống con lai mang nhiều đặc điểm khác biệt về hình thái bên ngoài so với cây bố mẹ. Cây con lai mang màu sắc hoa độc đáo sẽ được tiếp tục nhân lên phục vụ thị trường chơi hoa trong nước và hướng đến xuất khẩu.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Các bông hoa nở sau 3, 4, 5, 6 và 7 ngày được tiến hành tự thụ phấn và thụ phấn chéo giữa hai loài lan Hải: Hải Táo (*Paphiopedilum appletonianum*) và Hải Hồng (*Paphiopedilum delenatii*).

Nghiên cứu tự thụ phấn và thụ phấn chéo được thực hiện trong 2 năm liên tiếp (2022 - 2023) tại vườn bảo tồn thuộc Viện Khoa học Sự sống. Trái lan Hải sau khi thụ phấn 10 tháng được tiến hành gieo hạt trên các môi trường có nồng độ khoáng khác.

Điều kiện nuôi cấy in vitro

Hạt lan sau khi gieo trên các môi trường khoáng khác nhau được đặt trong điều kiện tối 60 ngày nhằm kích thích quá trình nảy mầm của hạt. Sau đó, mẫu thí nghiệm được đưa ra điều kiện chiếu sáng 30 ngày. Sự sinh trưởng tiếp theo của cây con được thực hiện dưới điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2.000 lux, nhiệt độ phòng nuôi 25 ± 2 °C với độ ẩm phòng là 60 - 70%.

2.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.2.1. Khảo sát khả năng thụ phấn nhân tạo và thụ phấn chéo giữa loài lan Hải Táo và lan Hải Hồng

Các bông hoa lan Hải của cả 2 loài sau khi nở được 3, 4, 5, 6 và 7 ngày tuổi được tiến hành thụ phấn nhân tạo và thụ phấn chéo nhằm đánh giá tỷ lệ đậu trái. Thời gian tiến hành thụ phấn và thụ phấn chéo được thực hiện lúc 9 - 10 giờ sáng. Chỉ tiêu theo dõi là số trái đậu và phát triển tiếp theo sau 10 tháng ngoài vườn bảo tồn.

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

Kế thừa nghiên cứu của Pierik và cộng sự [8], trái lan Hải lai sau khi khử trùng bề mặt được tách lấy hạt, mỗi bình nuôi cấy được gieo khoảng 300 ± 20 hạt trên 6 môi trường khoáng khác nhau ($\frac{1}{4}$ MS, $\frac{1}{2}$ MS, MS và $\frac{1}{4}$ SH, $\frac{1}{2}$ SH, SH) có bổ sung 0,2 mg/L BA, 0,1 mg/L NAA, 9 g/L agar, 30 g/L sucrose và 0,1 g/L than hoạt tính và pH 5,8. Trái lan Hải Táo và Hải Hồng được gieo trên môi trường $\frac{1}{2}$ SH có bổ sung các thành phần tương tự như trên theo Vũ Quốc Luận và cộng sự [11]. Chỉ tiêu theo dõi là tỉ lệ nảy mầm của hạt.

2.2.3. Khảo sát khả năng sinh trưởng của cây con lai giữa (Hải Táo x Hải Hồng) và những biểu hiện về mặt hình thái bên ngoài so với cây bố mẹ trong nuôi cấy in vitro

Cây con lan Hải lai và cây bố mẹ có cùng độ tuổi với kích thước đồng đều (1,5 - 2 cm) được nuôi cấy trên môi trường SH có bổ sung 1 mg/L BA, 0,5 mg/L NAA, 30 g/L sucrose, 1 g/L than hoạt tính, 8 g/L agar và pH = 5,8 [11]. Theo dõi các chỉ tiêu sau 4 tháng nuôi cấy: chiều dài lá, chiều rộng lá, diện tích lá, khối lượng tươi và bộ nhiễm sắc thể (NST).

2.3. Phương pháp xử lý mẫu và đo diện tích lá

Xử lý mẫu: Mẫu rễ non được cắt phần chóp rễ (1 - 2 mm) trong khoảng thời gian từ 8 - 10 giờ sáng. Mẫu rễ được cố định trong dung dịch colchicine 2% trong 4 giờ. Tiếp theo, rửa mẫu bằng nước cất và được xử lý trong KCl 0,075M trong 60 phút. Sau đó, mẫu được xử lý bằng dung dịch Carnoy (3 methanol : 1 acid acetic v/v) trong 12 giờ. Tiếp theo, mẫu chóp rễ được ngâm cồn 90° trong 15 phút, rửa lại 3 - 5 lần với cồn 70° và giữ mẫu trong cồn 70° ở nhiệt độ 4 - 5°C. Nhuộm mẫu: mẫu được thủy giải bằng HCl 1N trong thời gian 35 - 40 phút cho đến khi rễ mềm. Rửa mẫu 5 lần bằng nước cất và nhuộm mẫu bằng aceto carmin 1% ở nhiệt độ 65°C trong 2 giờ, sau đó đun nhẹ từ 5 - 7 phút trên ngọn lửa đèn cồn. Quan sát nhiễm sắc thể dưới kính hiển vi.

Đo diện tích lá: Diện tích lá được đo theo phương trình Quarrie và Jones, trong đó: Diện tích lá = Chiều dài x Chiều rộng x 0,75.

2.4. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, các số liệu được xử lý bằng phần mềm phân tích thống kê SPSS 16.0 theo phương pháp Duncan test với $p < 0,05$. Đối với thí nghiệm tự thụ phấn và thụ phấn chéo mỗi thí nghiệm được thực hiện trên 10 bông. Đối với thí nghiệm gieo hạt, mỗi lần gieo 5 bình, mỗi bình 300 ± 20 hạt. Đối với thí nghiệm đánh giá sự sinh trưởng và biểu hiện hình thái bên ngoài, mỗi lần xử lý 10 bình, mỗi bình 1 cây. Đối với thí nghiệm đếm bộ nhiễm sắc thể, cây con được nhân lên 3 lần liên tiếp và xử lý ra rễ, mỗi cây cắt 5 rễ/1 cây.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Khảo sát khả năng đậu trái thông qua thụ phấn nhân tạo và thụ phấn chéo giữa loài lan Hải Táo và lan Hải Hồng

Bảng 1. Khảo sát khả năng đậu trái thông qua thụ phấn nhân tạo và thụ phấn chéo giữa loài lan Hải Táo và lan Hải Hồng

Loài Lan Hải	Tuổi hoa nở (ngày)	Tỷ lệ đậu trái (%)
Hải Hồng	3	0,00 ^k
	4	13,33 ^{ij}
	5	30,00 ^{cde}
	6	36,66 ^{bc}
	7	23,33 ^{efg}
Hải Táo	3	16,66 ^{hi}
	4	33,33 ^{cd}
	5	63,33 ^a
	6	66,66 ^a
	7	43,33 ^b
Hải Táo (cây mẹ) x Hải Hồng (cây bố)	3	0,00 ^k
	4	6,66 ^{jk}
	5	20,00 ^{ghi}
	6	26,66 ^{def}
	7	16,66 ^{hi}
Hải Hồng (cây mẹ) x Hải Táo (cây bố)	3	0,00 ^k
	4	0,00 ^k
	5	0,00 ^k
	6	0,00 ^k
	7	0,00 ^k

Ghi chú: Các giá trị trong cùng 1 cột được đi kèm với các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.

Kết quả thu nhận sau 30 ngày thụ phấn và thụ phấn chéo giữa hai loài lan Hải cho thấy khả năng đậu trái có sự khác biệt rõ rệt giữa các độ tuổi của hạt phấn sau 3 - 7 ngày hoa nở (Bảng 1). Sau 3 ngày hoa nở cho thấy, chỉ thu được trái trên loài lan Hải Táo với tỉ lệ đậu trái thấp (16,66%), trong khi đó, trên loài lan Hải Hồng và hai cây bố mẹ thụ phấn chéo đều không thu nhận được trái đậu. Sau 4 ngày hoa nở, tỉ lệ đậu trái gia tăng thu được trên cả 2 loài được thụ phấn nhân tạo và cây lai chéo chỉ đạt 6,66% trên cây mẹ Hải Táo (Bảng 1). Sau 5 ngày hoa nở, tỉ lệ đậu trái có sự gia tăng rõ rệt trên hai loài Hải Hồng và Hải Táo với tỉ lệ tương ứng (30,00 - 63,33%) và cây mẹ lai chéo (Hải Táo) đạt 20,00%. Kết quả trái đậu cao nhất thu được sau 6 ngày hoa nở trên cả hai loài được thụ phấn nhân tạo đạt (36,66 - 66,66%, tương ứng) và trên cây Hải Táo lai chéo đạt 26,66% (Bảng 1, Hình 1). Kết quả sau 7 ngày hoa nở, tỉ lệ đậu trái có xu hướng giảm trên cả cây thụ phấn nhân tạo (23,33 - 43,33%) và cây lai chéo giảm xuống còn 16,66%. Kết quả này cho thấy, sự kết hợp giữa bầu nhụy và hạt phấn sau 7 ngày hoa nở bắt đầu chuyển sang giai đoạn lão suy, dẫn đến tỉ lệ đậu trái giảm. Trong suốt quá trình thụ phấn chéo giữa 2 loài Hải Hồng và Hải Táo, chúng tôi không thu nhận được trái đậu trên cây Hải Hồng, điều này cho thấy, lan Hải Hồng là loài đặc hữu của Việt Nam, có khu vực phân bố hẹp trong các khu rừng giáp ranh giữa 3 tỉnh (Lâm Đồng - Khánh Hoà - Đắk Lắk). Loài này được xếp vào danh mục thực vật có nguy cơ tuyệt chủng ngoài tự nhiên. Từ đó, lan Hải Hồng đã bị cô lập về mặt sinh sản và tạo ra hàng rào ngăn cản lớn trong quá trình lai tạo, bao gồm sự khác biệt về mặt di truyền và hình thái, thời gian nở hoa, vật trung gian phấn hoa, sự ức chế phát triển của ống phấn, sự đào thải sinh lý của tế bào hạt phấn và bầu nhụy đang phát triển. Trong một số nghiên cứu về ảnh hưởng của thời gian hoa nở lên quá trình đậu trái cho thấy, có sự khác biệt khá rõ nét về khoảng thời gian tối ưu cho quá trình thụ phấn để đạt được kết quả cao nhất. Trong nghiên cứu ảnh

hưởng về thời gian đến khả năng thụ phấn trên giống hành Tây (*Allium cepa* L) cũng cho thấy, hoa sau 3 ngày nở cho tỉ lệ đậu trái cao nhất [3]. Ảnh hưởng của thời gian ở một số thời điểm nở hoa trong ngày cũng cho thấy, giống khồ qua địa phương có độ hữu thụ cao nhất lúc 8 giờ 30 sáng và giống thương mại cho độ hữu thụ cao nhất lúc 11 giờ trưa [4]. Ảnh hưởng của bốn mùa trong năm lên khả năng đậu trái trên ba giống lan Hồ Điệp lai cũng cho thấy, mùa đông cho tỉ lệ đậu trái cao nhất và mùa hè cho tỉ lệ đậu trái thấp nhất [5]. Liu và cộng sự [12] đã tiến hành điều tra sự thụ phấn nhờ côn trùng của loài Lan Hải *P. cayrianum*, kết quả về tỉ lệ đậu trái tự nhiên đạt trung bình 25,7% trong ba mùa. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, độ hữu thụ của hạt phấn phụ thuộc rất nhiều vào đặc tính di truyền của từng loài. Do đó, cần có những nghiên cứu tỉ mỉ nhằm tìm ra khoảng thời gian thích hợp để tiến hành thụ phấn cho độ hữu thụ cao nhất trên từng loài lan Hải nói chung, cũng như để tiến hành lai chéo nhằm thu được các tổ hợp lai nhiều nhất.



Hình 1. Cây sử dụng cho quá trình thụ phấn (a), Cây tạo quả (b), Cây nở hoa và nảy mầm của hạt trên các môi trường khoáng khác nhau (c); a. Cây nở hoa, a1. Hài Hồng, a2. Hài Táo; b. Cây mang trái, b1. Hài Hồng, b2. Hài Táo; c. Hạt lan Hải lai nảy mầm trên các môi trường khoáng khác nhau.

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

Sự nảy mầm của hạt thu được trên 6 loại môi trường khoáng khác nhau cho thấy có sự khác biệt khá rõ rệt được trình bày trong bảng 2. Hạt lan Hải lai cho tỉ lệ nảy mầm cao nhất thu được trên môi trường $\frac{1}{2}$ SH với tỉ lệ 60,33% (Bảng 2, Hình 1c). Tỉ lệ nảy mầm đạt từ 50,33 - 55,00% thu được trên cả 3 môi trường khoáng ($\frac{1}{2}$ MS, $\frac{1}{4}$ MS, $\frac{1}{4}$ SH) (Bảng 2, Hình 1c) và tỉ lệ nảy mầm thấp thu được trên 2 môi trường SH và MS với tỉ lệ tương ứng (41,33 - 20,66%) (Bảng 2). Kết quả tỉ lệ nảy mầm của hạt lan Hải lai trong nghiên cứu này là thấp hơn so với hạt của cây bố mẹ được thụ phấn nhân tạo với các cây cùng loài khi được gieo trên môi trường đối chứng $\frac{1}{2}$ SH với tỷ lệ nảy mầm đạt (75,00 - 84,66%). Tỉ lệ nảy mầm thấp của hạt lan lai trong nghiên cứu này có thể là do sự khác biệt giữa bộ nhiễm sắc thể của cây con lai so với hai loài bố mẹ. Các cây lai F1 thường mang các đặc điểm trung gian về mặt hình thái giữa các cây bố mẹ về hầu hết chúng bị bất thụ hạt phấn. Sự phát triển chậm của nội nhũ hoặc phôi không phân chia là nguyên nhân chính gây ra tình trạng bất thụ ở các phép lai. Báo cáo của Lesar và cộng sự [13] cũng cho thấy, tỉ lệ hạt nảy mầm thấp trong nuôi cấy *in vitro* thu được từ các tổ hợp lai chéo giữa các giống lan Hồ Điệp thương mại đạt từ 5,5 - 43,1%. Khi tiến hành gieo hạt lan Hải lai và các loài đặc hữu cho thấy, tỉ lệ nảy mầm thường thấp hơn so các loài có vùng phân bố rộng. Long và cộng sự [6] đã tiến hành gieo hạt giống lan Hải lai *Paphiopedilum villosum* var. *Densissimum*, kết quả cho thấy tỉ lệ nảy mầm thấp trên cả 2 môi trường $\frac{1}{2}$ MS và MS với tỷ lệ nảy mầm tương ứng (21% và

14%). Zeng và cộng sự [7] đã tiến hành gieo hạt giống sau khi thụ phấn 180 ngày, kết quả tỉ lệ nảy mầm đạt 65,33% trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS và tỉ lệ nảy mầm này được gia tăng đáng kể (75,67%) khi hạt được đặt trong điều kiện tối 45 ngày và được đưa sang điều kiện chiếu sáng 16 giờ. Utami và cộng sự [9] đã tiến hành gieo hạt loài lan Hải Đuôi (*Paphiopedilum liemianum*) trên các môi trường khoáng khác nhau với tỉ lệ nảy mầm đạt từ 55,5 - 78,8%. Ragu và cộng sự [10] đã tiến hành khảo sát khả năng nảy mầm trên loài lan Hải (*Paphiopedilum lowii*) có nguy cơ tuyệt chủng ở Bắc Borneo. Kết quả cho thấy, tỉ lệ nảy mầm của hạt chỉ đạt 19,31% trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS. Tỉ lệ nảy mầm cao hay thấp của các loài lan Hải phụ thuộc vào độ tuổi của hạt lan, hạt lan Hải có độ tuổi khoảng 180 ngày cho tỉ lệ nảy mầm cao nhất và sau đó tỉ lệ nảy mầm có xu hướng giảm dần [6]. Tỷ lệ nảy mầm của hạt bị ức chế bởi môi trường có nồng độ muối khoáng cao như môi trường MS, chu kỳ chiếu sáng, cường độ chiếu sáng và nồng độ đường cao [8]. Như vậy, để gia tăng tỉ lệ nảy của hạt lan Hải trong nuôi cấy *in vitro* cần phải tiến hành khảo sát và đánh giá từng yếu tố nhằm tìm ra điều kiện tối ưu nhằm thu được tỉ lệ nảy mầm nhiều nhất. Trong nghiên cứu này, tỉ lệ nảy mầm của hạt lan Hải lai cao nhất (60,33%) thu được trên môi trường $\frac{1}{2}$ SH có bổ sung 0,2 mg/L BA, 0,1 mg/L NAA, 9 g/L Agar, 30 g/L đường, 0,2 g/L than hoạt tính.

Bảng 2. Đánh giá khả năng nảy mầm của hạt trên các môi trường khoáng khác nhau

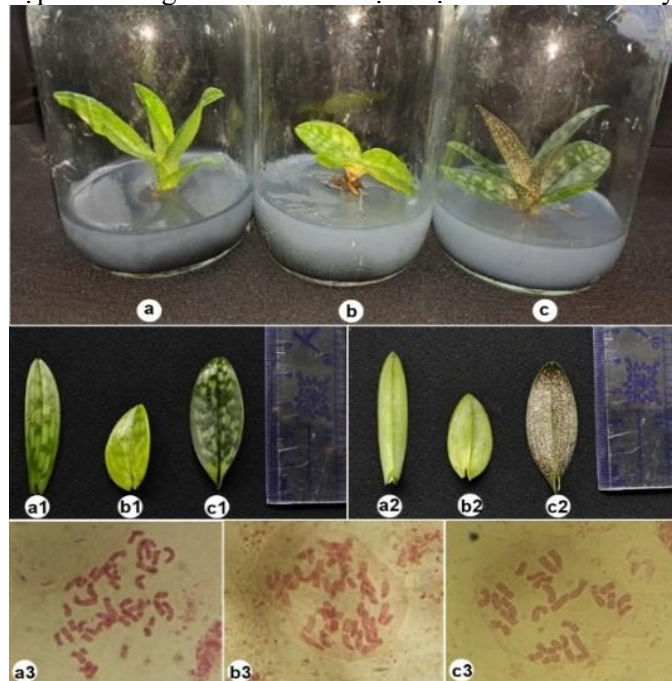
Nguồn mẫu	Môi trường nuôi cấy	Tỷ lệ nảy mầm (%)
Hạt lan lai giữa cây lan Hải Táo (Cây mẹ mang trái) x Hải Hồng (Cây bố)	$\frac{1}{4}$ SH	50,66 ^e
	$\frac{1}{2}$ SH	60,33 ^e
	SH	41,33 ^f
	$\frac{1}{4}$ MS	55,00 ^d
	$\frac{1}{2}$ MS	50,33 ^e
	MS	20,66 ^g
Hải Hồng	$\frac{1}{2}$ SH	75,00 ^b
Hải Táo	$\frac{1}{2}$ SH	84,66 ^a

Ghi chú: Các giá trị trong cùng 1 cột được đi kèm với các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.

3.3. Đánh giá khả năng sinh trưởng của cây con lai giữa Hải Táo x Hải Hồng và những biểu hiện về mặt hình thái bên ngoài so với cây bố mẹ trong nuôi cấy *in vitro*

Sự sinh trưởng, phát triển và thay đổi về mặt hình thái trong nuôi cấy *in vitro* của con lai giữa hai loài (Hải Táo x Hải Hồng) cho thấy có sự khác biệt hoàn toàn sau 4 tháng nuôi cấy được thể hiện qua bảng 3. Các chỉ tiêu theo dõi như chiều dài lá (2,76 cm), khối lượng tươi (1,25 g) thu được ở cây con lai là thấp hơn so với chiều dài lá và khối lượng tươi của cây bố mẹ. Trong khi đó, chiều rộng lá của cây con lai có sự khác biệt khá rõ rệt và là sự kết hợp trung gian giữa cây bố và cây mẹ (cây mẹ: 1,17 cm; cây con lai 1,80 cm; cây bố: 2,34 cm) (Bảng 3, Hình 2 a, b, c). Diện tích lá của cây con lai không có sự khác biệt so với cây mẹ và thấp hơn so với diện tích lá của cây bố. Khi quan sát về hình thái lá của con lai cho thấy có sự thay đổi về hình dạng lá so với cây bố mẹ như lá của cây con lai thu ngắn và có hình elip, trong khi đó lá cây bố mẹ có hình thuôn dài (Hình 2 a, b, c). Về hình dạng cây con lai cho thấy chúng mang hình dáng của cây bố nhiều hơn cây mẹ, những đốm màu trắng trên mặt lá của cây con lai lớn hơn so với cây mẹ và phân bố đều trên bề mặt lá gần giống so với cây bố (Hình 2 b, c). Những đốm màu tím lợt cũng đã xuất hiện nằm phía mặt dưới lá của con lai và những đốm màu tím này chỉ có ở mặt dưới của lá của cây bố và cây mẹ thì không có mang những đặc điểm này. Con lai mang kiểu hình bên ngoài của cây bố (Hải Hồng) nhiều hơn cây mẹ (Hải Táo) trong nghiên cứu này cũng cho kết quả tương tự như nghiên cứu về hình thái của con lai F1 trên hai giống Cải Dầu (F1 mang nhiều đặc điểm của cây bố nhiều hơn cây mẹ) [14]. Khi quan sát con lai giữa cây Cải Dầu tứ bội với cây lưỡng bội cho thấy, cây con lai mang đặc điểm hình thái chủ yếu nghiêng về cây mẹ, như lá nhỏ hơn đáng kể, dày hơn và có màu xanh đậm hơn, mép lá có khía gợn sóng với cuống lá màu hoa cà. Tuy nhiên, có vài đặc điểm giống với cây bố như sự phân nhánh, màu thân và kích thước quả [15]. Kết quả

của nghiên cứu này cho thấy, lá có dạng elip với những đốm lớn màu trắng nằm ở mặt trên và những đốm màu tím lợt nằm phía dưới mặt lá là những đặc điểm hình thái sớm để nhận dạng con lai giữa Hải Táo và Hải Hồng. Khi quan sát về sự phát triển lá của con lai cho thấy, chúng có xu hướng xòe ngang sang 2 bên (Hình 2b), trong khi đó, lá cây bố mẹ có xu hướng dựng thẳng (Hình 2a, c). Phần đỉnh chóp lá của cây con lai phía bên phải có sự phát triển nhô lên cao hơn giống với cây bố (Hình 2b1, b2), trong khi phần chóp lá của cây mẹ lại phát triển đều (Hình 2a1, a2). Sự sinh trưởng và phát triển hình thái của lá của cây lan Hải Táo và Hải Hồng trong nuôi cấy *in vitro* cũng cho thấy có nhiều điểm tương đồng về hình thái với cây trưởng thành được mô tả trong điều kiện sinh trưởng và phát triển ở điều kiện tự nhiên. Lá của cây lan Hải Hồng có lá hình bầu dục tới bầu dục thuôn, mép có lông rìa ở gần gốc, các đốm khảm xanh lá cây nhạt và thâm ở mặt trên, chấm dày màu tím ở dưới. Trên loài lan Hải Táo có lá thuôn hình bầu dục, tròn và hơi lõm ở chóp, mặt trên có các đốm khảm xanh thẫm và xanh nhạt xen kẽ, thường có các đốm tím tía [2]. Khi tiến hành quan sát bộ NST của cây bố mẹ và cây con lai cho thấy, cây con lai có bộ NST là $2n = 32$ (Hình 2b3), bộ nhiễm sắc thể của cây mẹ (Hải Táo, $2n = 38$, Hình 2a3) và cây bố (Hải Hồng, $2n = 26$, Hình 2c3) cũng phù hợp với những báo cáo về xác định bộ NST của 2 loài này [2].



Hình 2. Sự sinh trưởng và phát triển của con lai và những thay đổi về mặt hình thái bên ngoài của cây con lai và cây bố mẹ trong nuôi cấy *in vitro* sau 4 tháng nuôi cấy. a. Cây lan Hải Táo (cây mẹ), b. Cây con lai, c. Cây lan Hải Hồng (cây bố), a1. Mặt trên của lá cây mẹ, b1. Mặt trên của lá cây con lai, c1. Mặt trên của lá cây bố; a2. Mặt dưới của lá cây mẹ, b2. Mặt dưới của lá cây con lai, c2. Mặt dưới của lá cây bố; a3. Bộ nhiễm sắc thể của cây mẹ (Hải Táo): $2n = 38$, b3. Cây con lai: $2n = 32$, c3. Cây bố (Hải Hồng): $2n = 26$.

Bảng 3. Đánh giá sự sinh trưởng và phát triển của cây con lai và cây bố mẹ trong nuôi cấy *in vitro* sau 120 ngày nuôi cấy

Cặp lai	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)	Diện tích lá (cm ²)	Khối lượng tươi (g)	Bộ NST $2n$
Cây mẹ (Hải Táo)	4,35 ^b	1,17 ^c	3,83 ^b	1,51 ^b	38
Cây con lai	2,76 ^c	1,80 ^b	2,74 ^b	1,25 ^c	32
Cây bố (Hải Hồng)	4,60 ^a	2,34 ^a	8,09 ^a	2,24 ^a	26

Ghi chú: Các giá trị trong cùng 1 cột được đi kèm với các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $p < 0,05$ trong phép thử Duncan.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sau 6 ngày hoa nở cho tỉ lệ đậu trái cao nhất loài lan Hải Táo 66,66%, lan Hải Hồng đạt 36,66% và trên cây Hải Táo lai chéo đạt 26,66%. Hạt lan Hải lai cho tỉ lệ nảy mầm cao nhất thu được trên môi trường $\frac{1}{2}$ SH với tỉ lệ 60,33%, lan Hải Hồng đạt 75% và lan Hải Táo đạt 84,66%.

Cây con lai cho khả năng sinh trưởng và phát triển thấp hơn so với cây bố mẹ về chiều dài lá và khối lượng tươi trong nuôi cấy *in vitro*. Trong khi đó, chiều rộng lá của cây con lai là sự kết hợp trung gian giữa cây bố và cây mẹ. Cây con lai giữa hai loài Hải Táo và Hải Hồng mang những đặc điểm hình thái như lá có dạng elip với những đốm lớn màu trắng nằm ở mặt trên và những đốm màu tím lợt nằm phía dưới mặt lá là những đặc điểm hình thái sớm để nhận dạng con lai giữa Hải Táo và Hải Hồng và chúng mang bộ NST $2n = 32$.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] M. Jangyukala and L. Hemanta, "Review on advances in production of hybrids in orchids," *STM Journals*, vol. 10, no. 3, pp. 15-20, 2021.
- [2] L. V. Averyanop, K. L. Phan, and T. H. Nguyen, "Natural intraspecific hybridization in the genus *Paphiopedilum* (Orchidaceae: Cypripedioideae) in Vietnam," *Orchids*, no. 76, pp. 209-219, 2007.
- [3] W. N. Chang and S. Esther, "Influence of temperature, time of day, and flower age on pollen germination, stigma receptivity, pollen tube growth, and fruit set of *Allium cepa* L.," *Journal of the American Society for Horticultural Science*, vol. 101, no. 1, pp. 81-83, 1976.
- [4] D. T. P. Phan, T. D. Nguyen, and V. B. Vu, "Pollen fertility at different flowering times and its effect on seed setting of some bitter melon (*Momordica charantia* L.) varieties in Ho Chi Minh city," *Viet Nam Journal of Science and Technology*, vol. 66, no. 2, pp. 39-43, 2024.
- [5] K. Balilashaki, S. Gantait, R. Naderi, and V. Maryam, "Capsule formation and asymbiotic seed germination in some hybrids of *Phalaenopsis*, influenced by pollination season and capsule maturity," *Physiology and Molecular Biology of Plants*, vol. 21, no. 3, pp. 341-347, 2015.
- [6] B. Long, X. Alex, Niemiera, C. Zhi-ying, and L. Chun-lin, "In vitro propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae)," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, no. 10, pp. 151-162, 2010.
- [7] S. J. Zeng, K. L. Wu, J. A. T. da Silva, J. Zhang, Z. Chen, N. Xia, and J. Duan, "Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid," *Scientia Horticulturae*, no. 138, pp. 198-209, 2012.
- [8] R. L. M. Pierik, P. A. Sprenkels, B. Van Der Harst and Q. G. Van Der Meys, "Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz *in vitro*," *Scientia Horticulturae*, no. 34, pp. 139-153, 1988.
- [9] E. S. W. Utami, H. Purnobasuki, T. Soedarti, and S. Hariyanto, "Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Paphiopedilum liemianum* fowlie, an endangered terrestrial orchid in northern sumatra, Indonesia," *Journal of Plant Sciences*, vol. 10, no. 1, pp. 25-34, 2015.
- [10] V. S. Ragu, R. Ombokou, R. Repin, D. Molidin, R. Miadin, and Z. A. Aziz, "In vitro seed germination of *Paphiopedilum lowii*, an endangered slipper orchid in north Borneo," *Biodiversitas*, vol. 23, no. 11, pp. 5687-5694, 2022.
- [11] Q. L. Vu, P. H. Nguyen, X. C. Hoang, T. H. Trinh, T. H. Vu, B. N. Nguyen, K. T. Do, and D. T. N. Duong, "Micropopagation of *Paphiopedilum callosum*," *Vietnam Journal of Biotechnology*, vol. 10, no. 3, pp. 487-494, 2012.
- [12] Q. Liu, X. L. Wang, P. M. Finnega, and J. Y. Gao, "Reproductive ecology of *Paphiopedilum spicerianum*: Implications for conservation of a critically endangered orchid in China," *Global Ecology and Conservation*, no. 23, pp. 1-8, 2020.
- [13] H. Lesar, N. Čeranič, D. Kastelec, and Z. Luthar, "Asymbiotic seed germination of *Phalaenopsis* Blume orchids after hand pollination," *Acta agriculturae Slovenica*, vol. 99, no. 1, pp. 5-11, 2012.
- [14] Y. K. Tu, H. W. Chen, K. Y. Tseng, Y. C. Lin, and B. J. Kuo, "Morphological and genetic characteristics of F1 hybrids introgressed from *Brassica napus* to *B. rapa* in Taiwan," *Botanical Studies*, vol. 61, no. 1, pp. 1-13, 2020.
- [15] Z. Wan, Y. Tan, M. Shi, Y. Xu, N. Aryamanesh, and G. Yan, "Interspecific introgression of male sterility from tetraploid oilseed *Brassica napus* to diploid vegetable *B. rapa* through hybridisation and backcrossing," *Crop and Pasture Science*, no. 64, pp. 652-659, 2013.