

THE INFLUENCE OF FRUIT MATURITY AND BASIC MEDIA ON SEED GERMINATION OF *PAPHIOPEDILUM EMERSONII* KOOP & P.J. CRIBB

Vu Thi Lan^{1*}, Nguyen Thi Mai Uyen²

¹TNU - University of Science, ²Yen Dung High School No.1, Bac Giang

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 25/3/2024	<i>Paphiopedilum emersonii</i> Koop & P.J. Cribb has a very narrow distribution in Vietnam, only found in some provinces such as Tuyen Quang, Thai Nguyen, Bac Kan, and Cao Bang. <i>Paphiopedilum emersonii</i> (<i>P. emersonii</i>) is a very popular flower for international visitors, so this species is increasingly exploited and threatened with extinction. Therefore, the study of <i>in vitro</i> propagation of <i>P. emersonii</i> is very essential. In this study, the fruit of <i>P. emersonii</i> was used as a sterilization material and non-symbiotic germination on different basic culture media to produce <i>in vitro</i> shoots. We have successfully studied a number of factors affecting the germination ability of <i>P. emersonii</i> . The results showed that fruits can be disinfected with 2% NaOCl solution for 30 minutes, the clean sample rate reaches 85% after 30 days. The ability of seed germination depends on the age of fruit and basic media. The suitable fruit age for germination is about 180 days after pollination. The suitable medium is ½ MS or ½ VW environment, germination time is 90 - 100 days. The germinated seeds developed protocorm and differentiated well into shoots on MS medium supplemented with 1.0 mg/L BAP, 0.5 mg/L NAA and 100 ml/L coconut water, 40 g/L potatoes homogeneous, banana homogeneous 30 g/L. These results are a premise for <i>in vitro</i> breeding studies of <i>P. emersonii</i> in Vietnam.
Revised: 29/6/2024	
Published: 29/6/2024	
KEYWORDS	
Fruit	
<i>Paphiopedilum emersonii</i>	
Media	
Germination	
Sterilization	

ẢNH HƯỞNG CỦA TUỔI QUẢ VÀ MÔI TRƯỜNG CƠ BẢN ĐẾN SỰ NẢY MẦM CỦA HẠT HẢI HƯƠNG LAN (*Paphiopedilum emersonii* Koop & P.J. Cribb)

Vũ Thị Lan^{1*}, Nguyễn Thị Mai Uyên²

¹Trường Đại học Khoa học - ĐH Thái Nguyên, ²Trường Trung học Phổ thông Yên Dũng số 1, tỉnh Bắc Giang

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 25/3/2024	Hải Hương lan có phạm vi phân bố rất hẹp ở Việt Nam, chỉ có ở một số tỉnh như Tuyên Quang, Thái Nguyên, Bắc Kạn và Cao Bằng. Hải Hương lan là loài cho hoa đẹp với sắc trắng tinh khôi, có hương thơm nhẹ và rất được yêu thích, vì vậy loài này ngày càng bị khai thác nhiều hơn và đang bị đe dọa tuyệt chủng. Trong nghiên cứu này, quả Hải Hương lan được sử dụng làm vật liệu khử trùng và nảy mầm không cộng sinh trên các môi trường nuôi cấy cơ bản khác nhau để tạo chồi <i>in vitro</i> . Chúng tôi đã nghiên cứu thành công một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng nảy mầm của hạt Hải Hương lan <i>in vitro</i> . Mẫu quả Hải Hương lan khử trùng bằng dung dịch NaOCl 2% trong 30 phút, tỷ lệ mẫu sạch đạt 85% sau 30 ngày. Độ tuổi quả phù hợp cho gieo hạt là 180 ngày sau thụ phấn. Môi trường gieo hạt phù hợp là môi trường ½ MS hoặc ½ VW, thời gian nảy mầm là 90-100 ngày. Các hạt nảy mầm đã phát triển tạo protocorm và biệt hóa tạo chồi tốt trên môi trường MS bổ sung BAP 1,0 mg/L, NAA 0,5 mg/L và nước dừa 100 ml/L, khoai tây 40 g/L, chuối 30 g/L. Những kết quả này là tiền đề cho các nghiên cứu nhân giống <i>in vitro</i> loài Hải Hương lan ở Việt Nam.
Ngày hoàn thiện: 29/6/2024	
Ngày đăng: 29/6/2024	
TỪ KHÓA	
Quả	
Hải Hương lan	
Môi trường	
Nảy mầm	
Khử trùng	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.9969>

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

1. Giới thiệu

Hài Hương lan có tên khoa học là *Paphiopedilum emersonii* Koop & P.J. Cribb, còn được gọi là Hài Trắng, Hài Hương duyên. Loài Hài Hương lan thuộc chi *Paphiopedilum*, tông Cypripedioideae, họ phụ Epidendroideae, họ Lan (Orchidaceae), bộ Măng tây (Asparagales), phân lớp Hành (Liliidae), lớp Một lá mầm (Monocotyledoneae), ngành Hạt kín (Angiospermatophyta), giới Thực vật (Plantae) [1]. Môi trường sống thay đổi gây nên bởi con người đã phá hủy nơi sống tự nhiên của các loài lan hài, tốc độ phát triển kinh tế, sự gia tăng dân số và việc buôn bán số lượng lớn là nhân tố chính làm suy giảm nhanh chóng số lượng các loài lan Hài ở Việt Nam. Các loài Lan hài rất nhạy cảm với sự thay đổi của môi trường nên bị đe dọa tuyệt chủng nghiêm trọng [2], [3]. Nhằm bảo tồn và nhân nhanh số lượng cá thể các loài Lan hài nói chung và Hài Hương lan nói riêng, các nhà khoa học đã ứng dụng công nghệ nuôi cấy hiện đại, đặc biệt là công nghệ nuôi cấy mô tế bào. Công nghệ này được Dương Tân Nhựt và cộng sự nuôi cấy thành công đầu tiên ở lan Hài Hồng năm 2005 và 2007 [4], [5]. Sau đó đã có nhiều nhà khoa học nuôi cấy *in vitro* thành công nhiều loài Lan hài bằng các phương pháp nuôi cấy mô khác nhau như hài Hăng [6], hài Hồng [7], hài Đỏ [8], hài Vân, hài Tam đảo [9].

Ở Việt Nam, Hài Hương lan phân bố ở phạm vi rất hẹp, chỉ có ở một số sườn núi đá vôi dựng đứng ở một số tỉnh như Tuyên Quang, Thái Nguyên, Cao Bằng, Bắc Kạn, Vĩnh Phúc. Hài Hương lan còn là một loài chỉ sinh sản tự nhiên bằng hạt, nên không thể tự nảy mầm trong tự nhiên mà bắt buộc phải nhờ sự cộng sinh với một số loài nấm rễ do hạt không có nội nhũ. Với màu hoa trắng tinh khôi, hương thơm nhẹ, Hài Hương lan rất được yêu thích, vì vậy loài này càng bị khai thác nhiều hơn và đang bị đe dọa tuyệt chủng. Hài Hương lan đã được liệt kê vào Phụ lục 1 của công ước CITES (Những loài thực vật bị đe dọa tuyệt chủng, nghiêm cấm xuất khẩu, nhập khẩu vì mục đích thương mại) [10]. Hiện nay, phương pháp nhân giống *in vitro* được ứng dụng rộng rãi trong nhân giống nhiều loại cây trồng có giá trị tại Việt Nam như Hồng môn [11], Thạch斛 [12], Đinh lăng [13], lan Trầm tím [14]. Việc nhân giống *in vitro* Hài Hương lan có vai trò rất quan trọng, vừa góp phần vào công tác bảo tồn nguồn gen, vừa hướng tới mục tiêu nhân giống phục vụ cho nhu cầu ngày càng cao về loài hoa đẹp, quý hiếm này để có thể đáp ứng nhu cầu tinh thần của con người. Hiện nay chưa có công bố nào về việc nhân giống *in vitro* lan Hài Hương lan ở Việt Nam và trên thế giới. Bài báo này chúng tôi báo cáo các kết quả nghiên cứu về hiệu quả khử trùng tạo vật liệu ban đầu và nghiên cứu ảnh hưởng của độ tuổi quả, môi trường cơ bản đến hiệu quả nảy mầm của hạt Hài Hương lan.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và điều kiện nuôi cấy

Vật liệu thực vật: Chồi và quả với độ tuổi khác nhau của loài Hài Hương lan khỏe mạnh, sạch bệnh và lưu giữ tại vườn lan Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học – Đại học Thái Nguyên đã được định danh [15] và sử dụng để làm nguồn vật liệu ban đầu cho thí nghiệm.

Môi trường nuôi cấy: Môi trường nuôi cấy sử dụng trong nghiên cứu là môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962) [16] bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng (ĐHST) và thành phần khác tùy môi trường nuôi cấy.

Điều kiện nuôi cấy: Hạt được nuôi cấy trên môi trường gieo hạt trong tối ở 2 - 3 tuần đầu, sau đó chuyển ra điều kiện chiếu sáng trong phòng nuôi cấy. Các nghiên cứu biệt hóa và phát triển của hạt nảy mầm, tái sinh chồi và sinh trưởng cây con *in vitro* được thực hiện trong điều kiện chiếu sáng của phòng nuôi cấy là 2.500 - 3.000 lux, nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ẩm độ 80% và chu kỳ quang là 16/8 (sáng/tối).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp khử trùng mẫu

Quả Hài Hương lan được rửa sạch dưới vòi nước chảy, ngâm trong xà phòng loãng khoảng 5 phút, tiếp theo rửa sạch xà phòng và tráng mẫu bằng nước cất, mang vào box cấy để khử trùng

bằng HgCl_2 0,1% trong 15 phút (chế độ KT1) hoặc khử trùng bằng NaOCl 1% trong 40 phút (KT2) và NaOCl 2% trong 30 phút (KT3). Sau đó rửa lại mẫu bằng nước cất khử trùng 3 - 5 lần. Quả sau khi khử trùng dùng dao bóc vỏ quả, tách lấy hạt và nuôi cấy trên môi trường MS trong các bình tam giác 250 ml. Mỗi công thức thí nghiệm cấy 10 bình, lặp lại 3 lần. Theo dõi hiệu quả khử trùng quả ở các chế độ khử trùng.

Các mầm ngủ (mới nhú lá mầm) được thu về và mang rửa sạch đất cát dưới vòi nước chảy, loại bỏ hết phần đất bẩn, sau đó rửa bằng xà phòng loãng, tiếp theo rửa sạch xà phòng, tráng lại bằng nước cất và đưa vào box cấy để khử trùng. Chế độ khử trùng sử dụng là dung dịch HgCl_2 0,2% trong 15 phút (KT4), HgCl_2 0,2% trong 20 phút (KT5) và chế độ khử trùng kép KT6 (khử trùng lần 1 trong 20 phút, rửa mẫu bằng nước cất và tiếp tục khử trùng lần 2 bằng dung dịch HgCl_2 0,2% trong 10 phút). Mẫu sau khi khử trùng được tráng lại 3-5 lần bằng nước cất vô trùng. Sau đó gấp mẫu và đặt lên giấy thấm để thấm khô mẫu và cấy vào các ống nghiệm chứa môi trường MS. Mỗi công thức khử trùng cấy 10 ống nghiệm, lặp lại 3 lần

Các chỉ tiêu theo dõi gồm: Tỷ lệ mẫu sạch (%) = số bình sạch/tổng số bình gieo hạt; Tỷ lệ mẫu nhiễm (%) = số bình nhiễm/tổng số bình gieo hạt.

Nghiên cứu ảnh hưởng của tuổi quả và môi trường tới khả năng nảy mầm của hạt

* Ảnh hưởng của tuổi quả đến khả năng nảy mầm của hạt: Quả Hải Hương lan thu ở các độ tuổi từ 140, 160, 180 ngày sau thụ phấn (DAP: Days After Pollination) được khử trùng bởi dung dịch NaOCl 2% trong 30 phút. Quả sau khi khử trùng dùng dao bóc vỏ quả, tách lấy hạt và nuôi cấy trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS. Mỗi thí nghiệm cấy 10 bình, lặp lại 2 lần, mỗi bình cấy lượng hạt tương đương nhau. Theo dõi khả năng nảy mầm của hạt ở các độ tuổi quả khác nhau: Quan sát đặc điểm hạt nảy mầm, thời gian hạt nảy mầm.

* Ảnh hưởng của môi trường đến khả năng nảy mầm của hạt: Các quả Hải Hương lan thu ở độ tuổi 180 DAP được khử trùng bằng dung dịch NaOCl 2% trong 30 phút và nuôi cấy trên các môi trường dinh dưỡng gồm MS, $\frac{1}{2}$ MS, VW, $\frac{1}{2}$ VW có bổ sung sucrose 30 g/L, than hoạt tính 1 g/L, agar 7 g/L, nước dừa 100 ml/L. Mỗi thí nghiệm cấy 10 bình, lặp lại 2 lần, mỗi bình cấy lượng hạt tương đương nhau. Theo dõi khả năng nảy mầm của hạt ở các môi trường nuôi cấy. Quan sát đặc điểm hạt nảy mầm, số hạt nảy mầm, thời gian hạt nảy mầm và chất lượng chồi.

Nghiên cứu sự phát triển cây mầm

Hạt nảy mầm trên môi trường gieo hạt được cấy chuyển sang môi trường P3 để kích thích sự biệt hóa và phát triển của hạt nảy mầm. Thành phần môi trường P3 như sau MS + BAP 1,0 mg/L, NAA 0,5 mg/L, chuối 30 g/L, khoai tây 40 g/L, nước dừa 100 ml/L.

Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học và trình ứng dụng Statgraphics centurion XVI. Các giá trị trung bình theo sau bởi các chữ cái khác nhau (a, b, c,...) trong cùng một cột ở các bảng số liệu thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo phép kiểm định Duncan với $p < 0,05$.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Hiệu quả khử trùng đối với mẫu quả và chồi Hải Hương lan

Qua nghiên cứu tài liệu cho thấy có nhiều chất hóa học như sodium hypochlorite (NaClO), calcium hypochlorite [Ca(OCl)_2], thủy ngân clorua (HgCl_2), hydrogen peroxide (H_2O_2)... đã được sử dụng để làm tác nhân khử trùng trong nuôi cấy *in vitro* trên đối tượng phong lan nói chung và lan Hải nói riêng do có hoạt tính diệt nấm và vi khuẩn cao.

Hiệu quả khử trùng đối với mẫu quả: Quả Hải Hương lan sau khi thụ phấn được theo dõi sự sinh trưởng và phát triển của quả. Chọn những quả có kích thước to, không dị dạng, không sâu bệnh để đem khử trùng và lấy hạt giống (Hình 1A-C). Để đánh giá hiệu quả khử trùng đối với mẫu quả Hải Hương lan, chúng tôi đã tiến hành ba lô thí nghiệm ở ba chế độ khử trùng khác nhau: (1) HgCl_2 0,1% trong 15 phút (chế độ KT1); (2) Khử trùng bằng NaOCl 0,1% trong 40 phút (KT2); (3)

NaOCl 2% trong 30 phút (KT3). Kết quả thu được được trình bày tại bảng 1 và Hình 1(A- C) cho thấy các chế độ khử trùng khác nhau đã có hiệu quả khử trùng khác biệt nhau rõ rệt. Khi sử dụng dung dịch NaOCl 1% - 2% có hiệu quả khử trùng cao hơn so với việc sử dụng dịch $HgCl_2$ 0,1%. Dung dịch NaOCl 2% được sử dụng trong thời gian 30 phút cho hiệu quả khử trùng tốt nhất, tỉ lệ mẫu sạch đạt 85,0% và tỷ lệ nhiễm giảm chỉ còn 15%. Đây là một tỉ lệ mẫu sạch khá cao thu được trong thí nghiệm khử trùng mẫu.

Bảng 1. Ảnh hưởng của chế độ khử trùng đối với quả và chồi ngủ Hải Hương lan

Công thức	Chế độ khử trùng	Hiệu quả khử trùng sau 30 ngày	
		Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)
Mẫu quả			
KT1	HgCl2 0,1%, 15 phút	56,25 c ± 8,83 b	43,75 ± 8,83 b
KT2	NaOCl 1%, 40 phút	68,75 b ± 8,83 b	31,25 ± 8,83 ab
KT3	NaOCl 2%, 30 phút	85,00 a ± 7,07 a	15,00 ± 7,07 a
Mẫu chồi ngủ			
KT4	HgCl ₂ 0,2%, 15 phút	15,6 ± 6,28 e	84,4 ± 6,28 e
KT5	HgCl ₂ 0,2%, 20 phút	25,0 ± 7,07 de	75,0 ± 7,07 de
KT6	HgCl ₂ 0,2%, 20 + 10 phút	35,0 ± 7,07 d	65,0 ± 7,07 d

Ghi chú: Tuổi quả: từ 160-180 DAP

Hiệu quả khử trùng đối với mẫu chồi ngủ: Các chồi ngủ được khử trùng bằng dung dịch $HgCl_2$ 0,2% theo ba công thức là KT4-KT6. Kết quả thu được cho thấy cả ba công thức khử trùng đều thu được hiệu quả khử trùng thấp hơn so với mẫu quả. Công thức KT4 và KT5 là hai chế độ khử trùng đơn (khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,2% trong 15 phút và 20 phút), hiệu quả thu được thấp hơn rõ rệt so với chế độ khử trùng kép KT6, tỷ lệ mẫu sạch thu được sau 30 ngày đạt tương ứng là 15,6 và 25,0%. Ở KT6, chế độ khử trùng kép, mẫu được khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,2% trong 20 phút (lần 1) và 10 phút (lần 2), thu được hiệu quả khử trùng cao hơn, tỷ lệ mẫu sạch sống đạt là 35,0%, tỷ lệ mẫu chết và nhiễm là 65,0%, đây là công thức khử trùng có tỷ lệ mẫu sống và sạch cao nhất trong các công thức thí nghiệm khử trùng mẫu chồi ngủ, mẫu rất tươi, xanh và khỏe (Hình 1F).



Hình 1. Kết quả khử trùng mẫu Hải Hương lan: Cây Hải Hương lan tự nhiên đang có hoa (A); Quả trước khi khử trùng (B); Hạt được tách từ quả và gieo trên môi trường MS (C); Mẫu chồi non trước khi khử trùng (D); Chồi sau khử trùng và cấy vào ống nghiệm (E); Mẫu sạch sống sau 30 ngày (F)

Theo Vũ Thị Lan và cộng sự, khi khử trùng quả Hải Đóm có độ tuổi 170 DAP bằng dung dịch $HgCl_2$ 0,1% trong 15 phút thu được tỷ lệ mẫu sạch đạt 87,5%. Các hạt nảy mầm sau khoảng 90 ngày nuôi cấy. Kết quả khử trùng bằng dung dịch NaOCl 2% trong thời gian 30 phút cho hiệu quả khử trùng tốt nhất (hiệu quả tốt hơn $HgCl_2$) và có hiệu quả làm rút ngắn thời gian nảy mầm của hạt

[17]. Chen và cộng sự công bố tỷ lệ nảy mầm cao nhất của lan Hải *P. spicerianum* đạt được ở môi trường RECW với chu kỳ nuôi 24 giờ tối sau khi xử lý với NaOCl 1,0% khoảng 40 phút và nảy mầm sau 30 ngày [18]. Như vậy, trong nghiên cứu này, hiệu quả khử trùng mẫu quả Hải Hương lan đạt cao nhất khi sử dụng dung dịch NaOCl 2% trong 30 phút, tỷ lệ mẫu sạch đạt 85% sau 30 ngày. Vì vậy chúng tôi sử dụng vật liệu hạt để nuôi cấy nhằm đánh giá sự nảy mầm và phát triển cây mầm *in vitro*.

3.2. Khả năng nảy mầm của hạt Hải hương lan ở các độ tuổi khác nhau

Các nghiên cứu trước đây cho thấy sự nảy mầm của hạt Lan hải phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm độ tuổi, cách thức xử lý hạt trước khi nuôi cấy, thành phần môi trường nuôi cấy, điều kiện nuôi cấy và phương pháp nuôi cấy [19]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành ba lô thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của độ tuổi quả Hải Hương lan đến khả năng nảy mầm của hạt. Ba lô thí nghiệm này tương ứng với ba độ tuổi 140, 160 và 180 DAP. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tuổi quả đến khả năng nảy mầm của hạt

Tuổi quả (DAP)	Tỷ lệ bình có hạt nảy mầm (%)	Thời gian nảy mầm (ngày)	Số hạt nảy mầm/bình	Kết quả gieo hạt <i>in vitro</i> sau 150 ngày
140	0,0 ± 0,0 b	Không nảy mầm	0,0 ± 0,0 c	Không nảy mầm
160	49,95 ± 16,65 ab	90 - 100	3,3 ± 1,5 b	Protocorm không phát triển và chết
180	81,80 ± 18,20 a	90 - 100	40,3 ± 7,2 a	Cây non <i>in vitro</i> hoàn chỉnh

Kết quả nuôi cấy thu được cho thấy có sự khác biệt rõ rệt về khả năng nảy mầm của hạt ở các độ tuổi khác nhau trên cùng môi trường nuôi cấy. Ở tuổi quả 140 DAP có đặc điểm vỏ màu vàng nhạt, sau khi tiến hành khử trùng bằng dung dịch NaOCl 2% trong thời gian 30 phút, quả được bóc ra và quan sát thấy trong lõi chỉ có khối mô màu trắng, số lượng hạt rất ít, chứng tỏ quả lúc này còn non. Sau khi theo dõi không thu được bình nào có hạt nảy mầm sau 90 -100 ngày nuôi cấy. Đối với mẫu tuổi quả 160 DAP: vỏ quả có màu vàng nhạt, sau khi tiến hành khử trùng, quả được bóc ra và quan sát thấy trong lõi có khối mô màu nâu nhạt, khi gõ có các hạt nhỏ li ti nhưng số lượng hạt ít, chứng tỏ quả Hải Hương lan giai đoạn này có số lượng hạt rất hạn chế. Sau thời gian khoảng 90-100 ngày nuôi cấy, tỷ lệ bình có hạt nảy mầm đạt 49,95% và số lượng hạt nảy mầm trên mỗi bình nuôi cấy rất ít đạt là 3,3 hạt/bình (Hình 2A). Các hạt nảy mầm và phát triển tạo phôi có màu trắng, sau tạo protocorm to nhưng không phát triển thành chồi mà đen dần và chết (Hình 2B).

Quả Hải Hương lan 180 ngày tuổi được thu hái có màu vàng sậm, được khử trùng bằng dung dịch NaOCl 2% trong 30 phút, bóc ra và quan sát bên trong thấy có khối mô màu nâu sậm, khi gõ thấy nhiều hạt nhỏ li ti rơi ra, giai đoạn này hạt đã trưởng thành so với hai giai đoạn trước. Để thu được quả Hải Hương lan trưởng thành 180 DAP này, chúng tôi đã bao gói quả bằng giấy bạc/ni lông để ngăn chặn sự phá hoại của côn trùng và bảo vệ quả tốt hơn. Sau thời gian 90 - 100 ngày nuôi cấy *in vitro* đã thu được số lượng hạt nảy mầm cao nhất, số lượng hạt nảy mầm trên mỗi bình là 40,3 hạt/bình, tỷ lệ bình có hạt nảy mầm đạt 81,80%. Các hạt nảy mầm phát triển tạo protocorm, tạo chồi và phát triển thành cây mầm. Tiếp tục nghiên cứu khả năng nuôi cấy *in vitro* của các chồi Hải Hương lan này.

Hiện nay chưa có các công bố về nuôi cấy *in vitro* Hải Hương lan từ hạt (quả) trên thế giới và tại Việt Nam. Li và cộng sự báo cáo hạt giống *P. concolor* (Lindl.) Pfitz có tỷ lệ nảy mầm của hạt 210 DAP là cao nhất (77,79%) [20]. Zhang và cộng sự đã nhân giống *P. armeniacum*, hạt giống 95 DAP có tỷ lệ nảy mầm hạt cao nhất (96,2%). Tiền xử lý hạt trưởng thành (180 DAP) bằng dung dịch sodium hypochlorite 1,0% trong 90 phút hoặc siêu âm ở 40 kHz trong 8 phút cải thiện tỷ lệ nảy mầm từ 0 đến 29,2% hoặc 19,7%, tương ứng [21]. Theo Vũ Thị Lan và cộng sự, tuổi quả lan Hải Đóm (*P.concolor*) từ 150 đến 210 DAP đều có khả năng nảy mầm và tỷ lệ nảy mầm của hạt cao nhất là 190 DAP [17]. Như vậy, trong nghiên cứu của chúng tôi, độ tuổi quả/hạt Hải Hương lan phù hợp để thu được hạt nảy mầm là khoảng 180 ngày sau thụ phấn.

3.3. Khả năng nảy mầm của hạt Hải Hương lan trên các môi trường khoáng khác nhau

Quả Hải Hương lan thu ở độ tuổi 180 DAP sau khử trùng được tách lấy hạt và nuôi cấy trên các môi trường dinh dưỡng gồm MS, $\frac{1}{2}$ MS, VW, $\frac{1}{2}$ VW (bảng 3). Kết quả thu được cho thấy trên các môi trường nuôi cấy đều thu được hạt nảy mầm với thời gian nảy mầm từ 90 đến 100 ngày, đặc điểm hạt nảy mầm giống nhau, tuy nhiên các môi trường nuôi cấy có sự khác biệt nhau rõ rệt về số lượng hạt nảy mầm.

Trên môi trường MS và VW, số lượng hạt nảy mầm ít, mỗi bình thí nghiệm chỉ thu được vài hạt nảy mầm (tương ứng là 8,7 và 8,3 hạt nảy mầm/bình), ngược lại trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS và $\frac{1}{2}$ VW cho tỷ lệ hạt nảy mầm cao, số lượng hạt nảy mầm trên mỗi bình môi trường khá nhiều (tương ứng là 46,0 và 42,3 hạt/bình). Điều này cho thấy có thể hàm lượng khoáng cao trên các môi trường đã ức chế hạt nảy mầm. Qua quan sát cho thấy, phôi hạt Hải Hương lan khi nảy mầm có hình dạng tròn, màu trắng trong nhưng rất nhỏ (Hình 2A). Theo Zhang và cộng sự, môi trường cơ bản tối ưu cho sự nảy mầm của hạt và sự phát triển của protocorm giai đoạn tiếp theo đối với *P. armeniacum* là môi trường $\frac{1}{8}$ MS đối với hạt 95 DAP và $\frac{1}{4}$ MS cho hạt 110 DAP [21]. *P. spicerianum* có tỷ lệ nảy mầm cao nhất ở môi trường RE bổ sung nước dừa. Tuy nhiên, protocorm có màu trắng và không phát triển được nữa. Trong cùng điều kiện nuôi cấy nảy mầm, MS bổ sung nước dừa có tỷ lệ nảy mầm thấp hơn nhưng protocorm lại xanh và khỏe hơn [18].

Như vậy, trong nghiên cứu của chúng tôi, môi trường gieo hạt phù hợp cho Hải Hương lan là môi trường $\frac{1}{2}$ MS hoặc $\frac{1}{2}$ VW, trên các môi trường này số lượng hạt nảy mầm nhiều và đã quan sát thấy quá trình biệt hóa của phôi hạt nảy mầm thành chồi hoàn chỉnh.

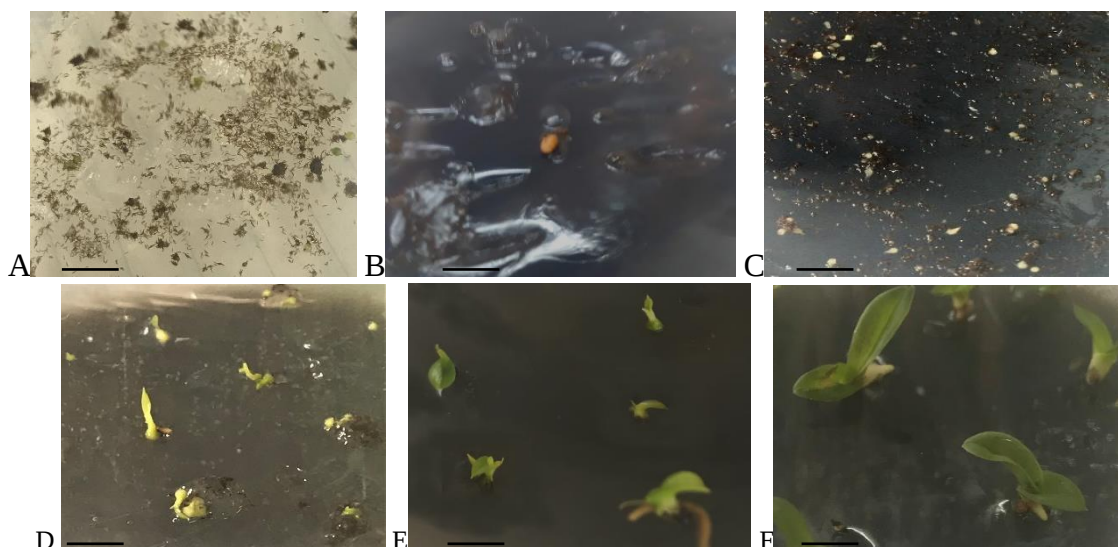
Bảng 3. Ảnh hưởng của môi trường cơ bản đến khả năng nảy mầm của hạt

Môi trường	Thời gian nảy mầm (ngày)	Đặc điểm hạt nảy mầm	Số lượng hạt nảy mầm/bình	Đặc điểm mầm chồi
MS	90 - 100	Phôi tròn, trắng	$8,7 \pm 3,2$ b	Nhỏ, vàng nhạt
$\frac{1}{2}$ MS	90 - 100	Phôi tròn, trắng	$40,3 \pm 7,2$ a	Nhỏ, vàng nhạt
VW	90 - 100	Phôi tròn, trắng	$8,3 \pm 3,5$ b	Nhỏ, vàng nhạt
$\frac{1}{2}$ VW	90 - 100	Phôi tròn, trắng	$42,3 \pm 6,4$ a	Nhỏ, vàng nhạt

3.4. Phát triển cây mầm

Từ các kết quả nghiên cứu trước, chúng tôi đã lựa chọn môi trường MS bổ sung chất ĐHST là BAP 1,0 mg/L, NAA 0,5 mg/L và các chất bổ sung là nước dừa 100 ml/L, khoai tây 40 g/L, chuối 30 g/L (P3) để tiếp tục đánh giá sự biệt hóa và phát triển của protocorm [22]. Trong nghiên cứu này, hạt nảy mầm tốt trên môi trường gieo hạt $\frac{1}{2}$ MS được cấy chuyển sang môi trường P3 có bổ sung các chất ĐHST và các chất bổ sung để thúc đẩy sự biệt hóa của protocorm. Kết quả cho thấy môi trường P3 có hiệu quả tốt thúc đẩy sự biệt hóa chồi khá tốt. Protocorm phát triển và hình thành mầm chồi sau khoảng 60 - 70 ngày, mầm chồi nhỏ có màu trắng hoặc vàng nhạt (Hình 2D). Trong quá trình theo dõi hạt nảy mầm và biệt hóa tạo chồi chúng tôi nhận thấy, quá trình nảy mầm từ phôi hạt lan Hải Hương lan không cộng sinh có tỷ lệ protocorm ngừng phát triển cao nên số lượng cây con thu được thấp. Hiện tượng này cũng đã được quan sát thấy đối với các loài lan Hải khác. Đối với loài *P. spicerianum* sau khi nảy mầm ở môi trường RE bổ sung nước dừa, protocorm có màu trắng và sau đó không tạo chlorophyll và sau đó chuyển sang nâu và chết [18]. Đối với lan *P. concolor*, có hiện tượng một số hạt nảy mầm và phát triển đến giai đoạn protocorm có thể không phát triển tiếp, đen dần và chết. Tỷ lệ chết cũng phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy và chiếm từ 6,2 - 31% [22].

Đây chính là khó khăn lớn khi nuôi cấy các loài lan Hải. Chồi non Hải Hương lan sinh trưởng rất chậm, từ khi hình thành mầm chồi đến khi chồi có 1-2 lá xanh hoặc rễ khá lâu khoảng 60- 90 ngày, do đó từ khi gieo hạt đến khi thu được cây con hoàn chỉnh có rễ và lá xanh khỏe mạnh là sau khoảng 6 tháng (Hình 2E). Cây mầm thường có lá hơi vàng, bé và mỏng (Hình 2F).



Hình 2. Kết quả nuôi cấy nảy mầm hạt không cộng sinh Hải Hương lan:

Hạt 160 DAP nảy mầm ít trên môi trường (A); Protocorm từ hạt 160 DAP bị vàng và chết (B); Phôi hạt 180 DAP nảy mầm và tạo protocorm trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS (C), Mầm chồi hình thành từ protocorm (D); Chồi Hải Hương lan in vitro sau 6 tháng với 1-2 lá hoặc rễ (E); Cây Hải Hương lan in vitro trên môi trường P3 sau 12 tháng (F). Môi trường P3: MS bổ sung BAP 1 mg/L + NAA 0,5 mg/L và nước dừa 100 ml/L + khoai tây 40 g/L + chuối 30 g/L. Thang đo: A, B, C, D: 5 mm, E, F: 1 cm

4. Kết luận

Chúng tôi đã nghiên cứu thành công ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng nảy mầm không cộng sinh của hạt Hải Hương lan. Khả năng nảy mầm của hạt phụ thuộc vào độ tuổi quả và môi trường nuôi cấy. Độ tuổi quả phù hợp để thu được hạt nảy mầm là khoảng 180 ngày sau thụ phấn và được nuôi trên môi trường gieo hạt phù hợp là môi trường $\frac{1}{2}$ MS hoặc $\frac{1}{2}$ VW, thời gian nảy mầm là 90-100 ngày. Các hạt nảy mầm đã phát triển tạo protocorm và biệt hóa tạo chồi tốt trên môi trường MS bổ sung BAP 1,0 mg/L, NAA 0,5 mg/L và nước dừa 100 ml/L, khoai tây 40 g/L, chuối 30 g/L. Đây là các kết quả bước đầu tạo tiền đề cho các nghiên cứu nhân giống in vitro Hải Hương lan tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] T. B. Nguyen, *List of Vietnamese plant species*, vol. 2, Hanoi: Agriculture, 2003.
- [2] L. V. Averyanov, P. Cribb, L. K. Phan, and H. T. Nguyen, *Slipper orchids of Vietnam*, Kew, UK: Compass Press Limited, The Royal Botanic Gardens, 2003.
- [3] V. P. Phung, T. T. Nguyen, and T. O. Pham, "Preliminary study of the current status and proposed solutions to preserve endangered plant species at Hang Kia nature reserve, Pa Co, Hoa Binh," *VNU Science Journal*, vol. 29, no. 4, pp. 36-43, 2013.
- [4] T. N. Duong, T. V. Tran, T. T. T. Dang, Q. L. Vu, T. Nguyen, and V. K. Dinh, "Micropropagation of *Paphiopedilum delenatii* via stem node culture," *Vietnam – Korea International Symposium, Bio-Technology & Bio-System Engineering*, pp. 184-190, 2005.
- [5] N. T. Duong, T. T. T. Dang, D. T. Nguyen, L. Q. Vu, H. T. Nguyen, V. T. K. Tran, and C. C. C. Chendanda, "In vitro stem elongation of *Paphiopedilum delenatii* Guillaumin and shoot regeneration via stem node culture," *Propagation of Ornamental Plants*, vol. 7, no. 1, pp. 29-36, 2007.
- [6] X. N. Dang, "Research on techniques for breeding and cultivating seedlings of two species of Vietnamese *Paphiopedilum* orchid," Final report on Science and Technology project, Institute of Applied Technology, Hanoi, 2006.
- [7] Q. L. Vu, P. H. Nguyen, K. T. Do, and T. N. Duong, "Using the cutting method and planting directly into the nursery of Pink *Paphiopedilum* orchid (*Paphiopedilum delenatii*) (In Vietnamese)," *Journal of Biology*, vol. 36, no. 1se, pp. 272-276, 2014.

- [8] T. T. Nguyen, D. T. Nguyen, X. T. Dao, D. T. Chu, and B. X. Ngo, "In vitro Propagation of a Vietnam Endemic Lady's Slipper Orchid (*Paphiopedilum vietnamense* O.Gruss & Perner)," *Journal of Horticulture and Plant Research*, vol. 1, pp. 1-8, 2018.
- [9] L. Q. Vu, C. K. Le, T. T. Hoang, H. T. Vu, H. Tran, and N. T. Duong, "Effects of shoot tip removal, wounding manipulation, and plant growth regulators on shoot regeneration and plantlet development in *Paphiopedilum* species," *Scientia Horticulturae*, vol. 256, 2019, Art. no. 108648.
- [10] CITES, *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*, Appendices I, Geneva, Switzerland, 2013.
- [11] V. K. Dinh, X. H. Phan, T. T. H. Nguyen, and T. P. H. Nguyen, "In vitro regeneration and acclimatization of *Anthurium scherzerianum* schott plants," *Academia Journal of Biology*, vol. 44, no. 3, pp. 99-109, 2022.
- [12] Q. L. Vu, T. T. Hoang, T. H. Vu, D. K. Hoang, M. C. Do, T. H. Trinh, V. T. V. Bui, and T. N. Duong, "Effect of factors on growth and development of *Dendrobium officinale* kimura et migo cultured in vitro and ex vitro," *Journal of Biotechnology*, vol. 19, no. 2, pp. 321-335, 2021.
- [13] T. N. T. To, P. Y. Truong, A. T. Ton, T. T. Hoang, T. M. N. Ha, and T. N. Duong, "Somatic embryogenesis of *Polyscias fruticosa* L. Harms) through culture Ex vitro leaf explant culture (In Vietnamese)," *Journal of Biotechnology*, vol. 18, no. 3, pp. 497-506, 2020.
- [14] T. S. Vu and T. H. Y. Nguyen, "Research on some conditions for culturing and caring for *Dendrobium parishii* in vitro," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 228, no. 01, pp. 465-473, 2023.
- [15] Y. T. H. Nguyen, M. H. Chu, and P. T. Do, "Using morphological characteristics and DNA barcode to identify the *Paphiopedilum emersonii* (In Vietnamese)," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 225, no. 11, pp. 18-25, 2020.
- [16] T. Murashige and F. Skoog, "A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures," *Physiol Plant*, vol. 15, pp. 473-497, 1962.
- [17] T. L. Vu, T. T. Y. Hoang, T. P. Do, and V. P. Nguyen, "Factors affecting high frequency germination and regeneration in vitro from seeds of *Paphiopedilum concolor* (Bateman) Pfitzer," *Propagation of Ornamental Plants*, vol. 23, no. 1, pp. 13-21, 2023.
- [18] Y. Chen, U. M. Goodale, X. Fan, and J. Y. Gao, "Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Paphiopedilum spicerianum*: An orchid with an extremely small population in China," *Global Ecology and Conservation*, vol. 3, pp. 367-378, 2015.
- [19] S. Zeng, W. Huang, K. Wu, J. Zhang, J. Duan, and J. A. Teixeira da Silva, "In vitro propagation of *Paphiopedilum* orchids," *Crit Rev Biotechnol*, vol. 36, no. 3, pp. 521-534, 2016.
- [20] X. L. Li, C. Y. Huang, Q. Song, J. Y. Zhou, and X. G. Wang, "In vitro asymbiotic germination and propagation of *Paphiopedilum concolor* (Lindl.) Pfitz.," *Plant Science Journal*, vol. 34, no. 1, pp. 127-134, 2016.
- [21] Y. Y. Zhang, K. L. Wu, J. X. Zhang, R. F. Deng, J. Duan, J. A. Teixeira daSilva, H. Wei Chang, and S. J. Zeng, "Embryo development in association with a symbiotic seed germination in vitro of *P. armeniacum* S. C. Chen et F. Y. Liu.," *Scientific Reports*, vol. 5, p. 16356, 2015.
- [22] T. L. Vu, Q. K. Nguyen, and T. P. Do, "Effect of basal medium and plant growth regulators on seed germination, differentiation and shoot regeneration of *Paphiopedilum concolor* (Lindl Pfitz) (In Vietnamese)," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 227, no. 10, pp. 82-90, 2022.