Tạp chí Công nghệ Sinh học **19**(1): 155-163, 2021

NHÂN GIỐNG VÔ TÍNH LAN HÀI ĐÀ LẠT *(PAPHIOPEDILUM X DALATENSE)*

Trần Thái Vinh, H' Yon Niê Bing, Đặng Thị Thắm, Nguyễn Thị Thanh Hằng, Vũ Kim Công, Nông Văn Duy✉

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: duynongvan@yahoo.com

Ngày nhận bài: 28.10.2019
Ngày nhận đăng: 08.6.2020

TÓM TẮT

Lan Hài Đà Lạt *(Paphiopedilum x dalatense)* là một loài hiếm, cho hoa to với màu sắc biến đổi và lá có những đường vằn với những đốm khảm đẹp khó thấy. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của hai nhóm chất hữu cơ khác nhau: Nhóm khoai tây, chuối và nhóm tryptone, nấm men, peptone lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Hài Đà Lạt; ảnh hưởng của NAA và acid humic đến sự ra rễ *in vitro* đã được khảo sát. Kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường thích hợp cho sự hình thành và phát triển chồi cây là môi trường nuôi cấy MS bổ sung 100 g/L chuối và 100 g/L khoai tây (5,4 chồi/mẫu, 18,8 mm/chồi, 4,5 lá/chồi, 100% chồi sống) hoặc môi trường nuôi cấy MS bổ sung 1 g/L peptone (4,19 chồi/mẫu, 15 mm/chồi, 4 lá/chồi và 92% chồi sống). Môi trường thích hợp cho sự tạo rễ *in vitro* lan Hài Đà Lạt là môi trường nuôi cấy ½ MS bổ sung 1 mg/L NAA (5,2 lá/mẫu, 4,6 rễ/chồi, 3,56 cm/rễ, 100% chồi hình thành rễ). Tỷ lệ ra rễ đạt 100% trên môi trường nuôi cấy ½ MS bổ sung 2 mg/L acid humic và số rễ, chiều dài rễ đạt cao nhất (5 rễ/chồi, 5,5 cm/rễ) trên môi trường này. Kết quả nghiên cứu nhân giống *in vitro* lan Hài Đà Lạt góp phần bảo tồn và phát triển bền vững cũng như hướng tới việc nhân nhanh cây giống khỏe mạnh phục vụ thương mại hóa loài lan Hài quý.

Từ khóa: *Acid humic, bảo tồn, in vitro, lan Hài, lan Hài Đà Lạt.*

MỞ ĐẦU

Chi lan Hài (*Paphiopedilum*) có khoảng 75 loài, gồm nhiều loài lan quý hiếm, được tổ chức CITES công nhận và bảo vệ (Yu *et al*., 2011). Những loài lan thuộc chi này đang dần bị tuyệt chủng vì sự khai thác quá mức của con người. Đặc thù riêng của chi này là cây sinh trưởng chậm, tỷ lệ nảy mầm của hạt trong tự nhiên rất thấp.

Lan Hài Đà Lạt được Averyanov công bố trên tạp chí Orchid Digest năm 2001, là một dạng lai tự nhiên giữa *P. callosum* và *P. villosum*, một dạng hình thái trung gian giữa hai loài bố mẹ. Lâm Đồng là nơi có điều kiện thích hợp lý tưởng cho sự sinh trưởng của lan Hài Đà Lạt. Đây là một loài hiếm với hoa to, màu sắc biến đổi, lá có những đường vằn với những đốm khảm đẹp khó thấy (Averyanov *et al.*, 2004). Hiện nay, các loài lan Hài đang bị đe dọa và có nguy cơ tuyệt chủng nên việc nghiên cứu nhân giống lan Hài cần được chú trọng nhằm mục đích bảo tồn nguồn gen thực vật quý hiếm và thương mại hóa. Một số công trình nghiên cứu nhân giống *in vitro* lan Hài đã được công bố như: *P. rothschildianum* (Chyuam *et al.*, 2010); *P. wardii* (Songjun *et al*., 2012); *P. callosum* (Vũ Quốc Luận *et al.*, 2014); *P. vietnamense* (Tinh *et al*., 2017); *P. villosum (*Raj *et al.*, 2018). Acid humic đóng một vai trò quan trọng trong nuôi cấy mô thực vật là hormone tăng trưởng cho nhân giống *in vitro* (Dhanapal, Sekar, 2013). Cho đến nay chưa có công trình nào công bố về ảnh hưởng của acid humic lên quá trình nhân giống *in vitro* các loài thuộc họ Lan. Để góp phần vào công tác bảo tồn nguồn gen cũng như hướng tới việc nhân nhanh cây con phục vụ

thương mại hóa loài hoa đẹp, quý hiếm, có giá trị thẩm mỹ cao thì việc xác định ảnh hưởng của một số loại hợp chất hữu cơ, NAA và acid humic lên quá trình sinh trưởng, phát triển của lan Hài Đà Lạt nuôi cấy *in vitro* là việc làm cấp thiết và có ý nghĩa.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Nguồn mẫu ban đầu là chồi *in vitro* của lan Hài Đà Lạt được nuôi cấy tại Phòng Tài nguyên thực vật, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường nền được sử dụng là môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) hoặc ½ MS có bổ sung thêm 30 g/L sucrose, 8 g/L agar, 10% nước dừa và 1 g/L than hoạt tính. Ngoài ra, tùy theo mục đích thí nghiệm mà môi trường nuôi cấy sẽ bổ sung thêm dịch chiết chuối, khoai tây, peptone, tryptone, dịch chiết nấm men, acid humic và chất điều hòa sinh trưởng thực vật (NAA). Cách làm dịch chiết: Chuối tiêu chín bỏ vỏ, xay nhỏ mịn; khoai tây để cả vỏ rửa sạch luộc chín dùng cả nước luộc xay nhỏ mịn. Tất cả các môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH = 5,8 và được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121^{o}C, áp suất 1 atm, trong 25 min. Mẫu sau khi cấy được nuôi trong điều kiện nhiệt độ 25 ± 2^{o}C, cường độ chiếu sáng 35 µmol.m^{-2}.s^{-1} thời gian chiếu sáng 8h (Đặng Thị Thắm *et al*., 2018).

Tái sinh chồi *in vitro*

Với mỗi bình thí nghiệm, 3 chồi có chiều cao 6 mm được cấy vào môi trường nuôi cấy MS có bổ sung riêng rẽ hay kết hợp dịch chiết chuối (0, 50, 100, 150 g) và khoai tây (0, 100, 150, 200 g) hoặc môi trường nuôi bổ sung tryptone, nấm men và peptone ở nồng độ 1 g/L.

Hình thành cây *in vitro* hoàn chỉnh

Các chồi cây lan Hài Đà Lạt tương đối đồng đều về chiều cao được lựa chọn và cấy trên môi trường ½ MS bổ sung riêng rẽ NAA ở các nồng độ 0; 0,5; 1; 1,5; 2 mg/L và acid humic ở các nồng độ 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 mg/L.

Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Mỗi nghiệm thức được cấy 5 bình, mỗi bình cấy 3 mẫu. Số liệu thu thập được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và phần mềm phân tích thống kê IRRISTAT 5.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của dịch chiết chuối và khoai tây lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Hài Đà Lạt nuôi cấy *in vitro*

Kết quả thu được ở Bảng 1 cho thấy, các chất bổ sung khác nhau (chuối, khoai tây) có ảnh hưởng khác nhau đến số chồi, số lá, chiều cao chồi và tỷ lệ sống của chồi. Trong các nghiệm thức cùng bổ sung một chất nhưng ở các nồng độ khác nhau cũng ảnh hưởng đến các chỉ tiêu theo dõi. Môi trường bổ sung chuối và khoai tây có sự hình thành và phát triển chồi cây tốt hơn so với môi trường đối chứng sau 90 ngày nuôi cấy. Theo Islam và đồng tác giả (2000) thì chuối, khoai tây, khoai sọ có chứa niacin và một số vitamin; có tác dụng kích thích sự nảy mầm và sinh trưởng của cây lan.

Mohamed và đồng tác giả (2010) đã sử dụng khoai tây như một chất làm đông thay cho agar, khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy 50 hoặc 60 g/L khoai tây + 1 g/L agar đã làm tăng số lượng chồi, số chồi trên mẫu đạt cao nhất là 6,8 chồi trên đối tượng khoai tây. Trong nghiên cứu này, khi bổ sung riêng lẻ khoai tây vào môi trường nuôi cấy chồi phát triển mạnh hơn và tỷ lệ chồi sống cao hơn đối chứng. Ở nghiệm thức bổ sung 100 g/L khoai tây (NT4) cho 1,97 chồi trên mẫu, 3 lá/chồi, chồi cao trung bình 15,5 mm và 70% chồi sống. Tuy nhiên, khi tăng hàm lượng khoai tây 150 đến 200 g/L (NT5, NT6) thì sự hình thành và sinh trưởng chồi giảm xuống. Điều này có thể giải thích là do khi bổ sung hàm lượng khoai tây cao làm đặc môi trường nuôi cấy dẫn tới giảm sinh trưởng cũng như tỷ lệ sống của chồi. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của

Norhayati và đồng tác giả (2011) khi bổ sung 100 g/L khoai tây đã gia tăng hệ số nhân lên 3 lần trên đối tượng *Celosia* sp. Phùng Văn Phê và đồng tác giả (2010) đã bổ sung 100 g/L khoai tây trong nuôi cấy lan Kim tuyến, kết quả thu được hệ số nhân tăng lên gấp 5,5 lần sau 8 tuần nuôi cấy.

Chuối được thêm vào môi trường nuôi cấy hoa lan để thúc đẩy tăng trưởng. Bởi chuối có hàm lượng fructose, glucose và nitrat cao, khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy làm tăng hàm lượng khoáng và đường (Aktar *et al*., 2008). Pierik và đồng tác giả (1988) cho rằng chuối có tác dụng ổn định pH của môi trường nuôi cấy, thúc đẩy sự phát triển của cây con sau khi nảy mầm. Kết quả ở Bảng 1 cho thấy trên môi trường nuôi cấy bổ sung chuối chồi cây phát triển mạnh và có sự khác biệt các chỉ tiêu theo dõi so với trên môi trường bổ sung khoai tây. Khi hàm lượng chuối được bổ sung tăng từ 50 đến 100 g/L, sự hình thành và phát triển chồi tăng lên. Đặc biệt, sự hình thành và phát triển chồi cây tốt trên môi trường nuôi cấy bổ sung 100 g/L chuối (NT2) với 4,6 chồi/mẫu, trung bình 4,3 lá/chồi, chồi cao 18 mm và 90% chồi sống. Tuy nhiên, khi hàm lượng chuối tăng lên 150 g/L (NT3) các chỉ tiêu theo dõi có xu hướng giảm. Saranjeet và đồng tác giả (2012) cho rằng trong môi trường nuôi cấy loài *Cymbidium pendulum* khi bổ sung hàm lượng chuối cao trên 75 g/L gây bất lợi cho sự sống của mẫu cấy, protocorm bị hoại tử và chết. Kết quả tỷ lệ tái sinh cao trong nghiên cứu này phù hợp với kết quả tái sinh chồi trên đối tượng lan Vân Hài (Vũ Quốc Luận *et al*., 2014).

Bảng 1. Ảnh hưởng của chuối và khoai tây lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Hài Đà Lạt nuôi cấy *in vitro.*

NT	Số chồi/mẫu	Số lá/chồi	Chiều cao (mm)	Tỷ lệ sống (%)
ĐC	1,27	4,00	14,00	50
NT1: 50 g chuối	2,91	3,20	22,00	75
NT2: 100 g chuối	4,60	4,30	18,00	90
NT3: 150 g chuối	3,11	3,50	19,00	80
NT4: 100 g khoai tây	1,97	3,00	15,50	70
NT5: 150 g khoai tây	1,38	3,10	16,50	65
NT6: 200 g khoai tây	1,42	3,20	17,00	55
NT7: 50 g chuối + 100 g khoai tây	3,13	3,70	20,00	78
NT8: 100 g chuối + 100 g khoai tây	5,40	4,50	18,80	100
NT9: 50 g chuối + 100 g khoai tây	4,62	3,00	21,00	88
$LSD_{0.05}$	0,45	0,18	1,55	
CV (%)	8,70	3,00	5,00	

Đặc biệt, trong môi trường nuôi cấy bổ sung kết hợp dịch chiết chuối và khoai tây, khả năng hình thành và phát triển chồi được cảm ứng mạnh, có sự gia tăng rõ rệt ở các chỉ tiêu theo dõi. Sau 90 ngày nuôi cấy, các công thức thí nghiệm đều có sự khác nhau về giá trị chỉ tiêu nghiên cứu. Trong đó, môi trường nuôi cấy MS bổ sung kết hợp 100 g/L chuối, 100 g/L khoai tây (NT8) tối ưu cho sự hình thành và phát triển chồi với 5,4 chồi/mẫu, chiều cao chồi đạt 18,8 mm/chồi, chồi trung bình có 4,5 lá có màu xanh đậm, 100% chồi sống (Hình 1d), các chồi bên được hình thành thêm. Khi gia tăng hàm lượng chuối lên 150 g/L kết hợp với 100 g/L khoai tây (NT9) thì

ức chế sự hình thành và phát triển chồi, lá có màu vàng nhạt. Kongbangkerd (2016) khi nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài *Bulbophyllum dhaninivatii*, kết quả thu được môi trường nuôi cấy bổ sung kết hợp 50 g/L khoai tây và 50 g/L chuối cho số lượng chồi cao nhất đạt 6,92 chồi. Cho đến nay vẫn chưa có công bố nào về việc bổ sung kết hợp chuối và khoai tây vào môi trường nuôi cấy nhân chồi trên đối tượng lan Hài. Đây có thể là hướng mới cho các nghiên cứu tiếp theo ở đối tượng khó nhân chồi *in vitro* như lan Hài. Như vậy, môi trường nuôi cấy MS bổ sung 100 g/L chuối kết hợp với 100 g/L khoai tây được sử dụng làm môi trường tạo chồi lan Hài Đà Lạt.

Ảnh hưởng của tryptone, nấm men và peptone lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Hài Đà Lạt nuôi cấy *in vitro*

Kết quả thu được trên Bảng 2 cho thấy, ở môi trường bổ sung tryptone, nấm men và peptone ở nồng độ 1 g/L có sự hình thành và phát triển chồi cây tốt hơn so với ở môi trường đối chứng. Theo nghiên cứu của Chyuam và đồng tác giả (2010), Songjin và đồng tác giả (2012), việc bổ sung các hợp chất hữu cơ vào môi trường nuôi cấy đã làm gia tăng số lượng và chiều cao chồi lan Hài, do chúng chứa các hợp chất nitơ hữu cơ giúp cây dễ hấp thu, từ đó thúc đẩy sự sinh trưởng và phát triển mẫu cấy. Mỗi hợp chất hữu cơ khác nhau như tryptone, nấm men và peptone cũng có sự tác động khác nhau đến các chỉ tiêu sinh trưởng như số lá, số chồi, tỷ lệ sống của mẫu cấy. Kết quả thu được sau 90 ngày nuôi cấy, môi trường có bổ sung riêng lẻ tryptone (NT1), nấm men (NT2) cùng nồng độ 1 g/L cho tỷ lệ sống của mẫu khá cao, lần lượt đạt 90% và 88%. Tuy nhiên, khả năng phát sinh chồi ở các nghiệm thức này thấp. Đặc biệt, trên môi trường bổ sung 1 g/L peptone (NT3), chồi sinh trưởng và phát triển tốt nhất đạt 4,19 chồi/mẫu, trung bình chồi cao 15 mm, 4 lá/chồi và 92% chồi sống, chồi to khỏe, lá màu xanh đậm (Hình 1e). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Chyuan và đồng tác giả (2010) khi bổ sung 1 g/L peptone giai đoạn tạo chồi bên loài *P. rothschildianum*. Nghiên cứu của Vũ Quốc Luận và đồng tác giả (2014) cho thấy chồi non lan Vân Hài *(P. callosum)* sinh trưởng và phát triển tốt nhất trên môi trường nuôi cấy bổ sung 1 g/L peptone. Như vậy, chồi non lan Hài Đà Lạt sinh trưởng và phát triển tốt nhất trên môi trường nuôi cấy MS bổ sung 1 g/L peptone.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tryptone, nấm men và peptone lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Hài Đà Lạt nuôi cấy *in vitro.*

NT	Số chồi/mẫu	Số lá/chồi	Chiều cao (mm)	Tỷ lệ sống (%)
ĐC	1,27	3,60	10,00	50
NT1: 1 g tryptone	1,57	4,10	16,00	90
NT2: 1 g nấm men	2,92	3,80	14,20	88
NT3: 1 g peptone	4,19	4,00	15,00	92
$LSD_{0.05}$	0,44	0,23	1,93	
CV (%)	8,9	3,00	7,00	

Ảnh hưởng của NAA đến khả năng tái sinh rễ của chồi lan Hài Đà Lạt nuôi cấy *in vitro*

Các chồi cây lan Hài Đà Lạt đồng đều về chiều cao được cấy trên môi trường ½ MS bổ sung NAA (0; 0,5; 1; 1,5; 2 mg/L), khả năng tái sinh rễ *in vitro* của chồi sau 60 ngày nuôi cấy được trình bày trên Bảng 3.

Hầu hết thực vật cần có auxin để cảm ứng tạo rễ (Nguyễn Đức Lượng, Lê Thị Thủy Tiên, 2006). Các auxin có tác dụng kích thích sự hình thành và kéo dài rễ. Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, NAA là auxin thường được dùng để cảm ứng tạo rễ. Sau 60 ngày nuôi cấy, tất cả các nghiệm thức đều có sự hình thành rễ. Ở nghiệm thức đối chứng không bổ sung NAA, rễ vẫn được

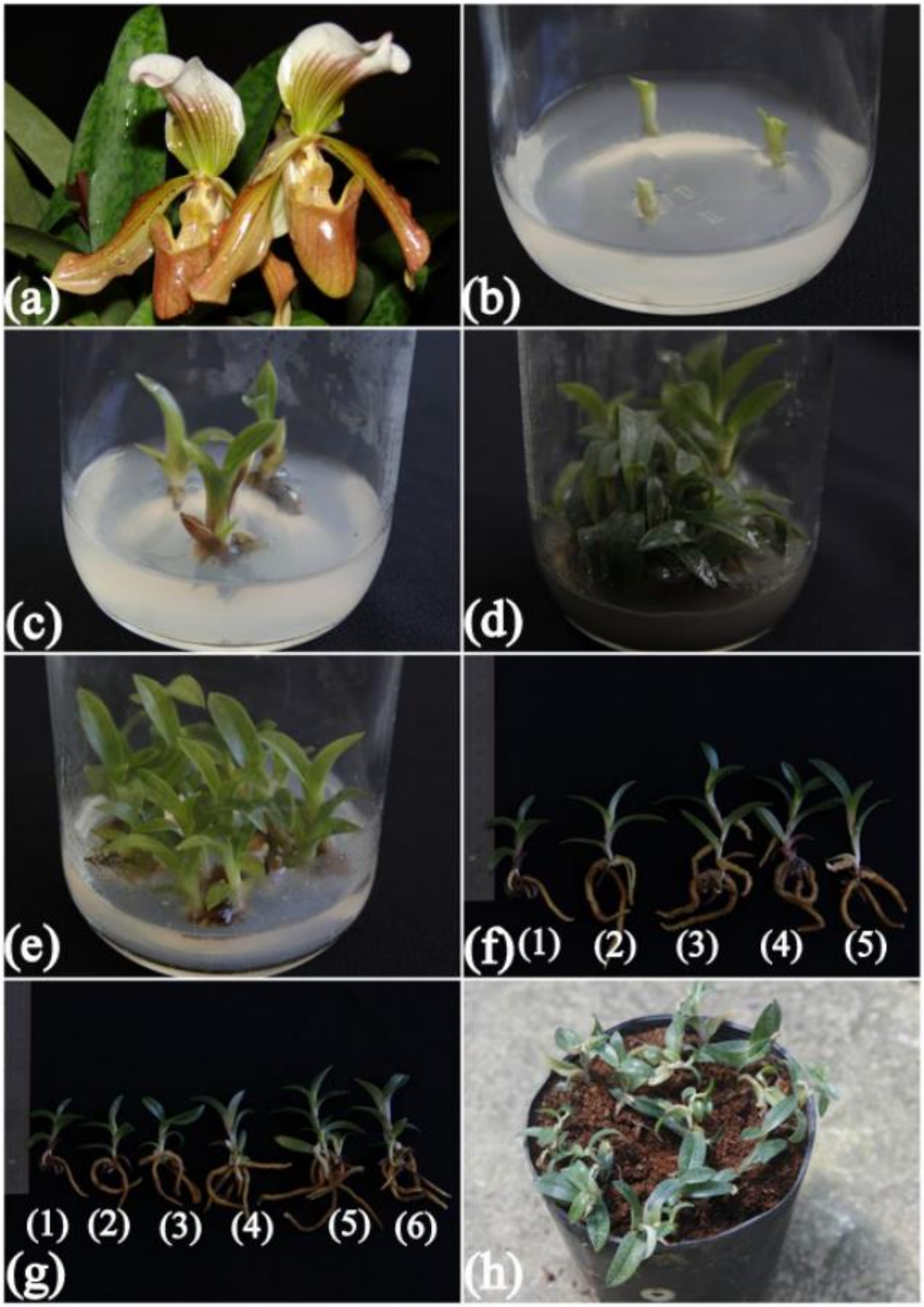
hình thành, điều đó chứng tỏ auxin nội sinh được hình thành ở chồi và di chuyển xuống dưới để cảm ứng tạo rễ. Tuy nhiên, khi bổ sung NAA vào môi trường nuôi cấy, thời gian hình thành rễ được rút ngắn và tỷ lệ ra rễ cao hơn (Bảng 3). Nghiệm thức bổ sung 0,5 - 1 mg/L NAA (NT1, NT2) cho kết quả tái sinh rễ tốt hơn so với những nghiệm thức còn lại, 100% chồi tạo rễ, rễ dài, khỏe. Trong đó, môi trường bổ sung 1 mg/L NAA (NT2) cho kết quả về các chỉ tiêu sinh trưởng là tốt nhất (5,2 lá/mẫu, 4,6 rễ/chồi, chiều dài rễ 3,56 cm). Khi tăng nồng độ NAA từ 1,5 - 2,0 mg/L thì quá trình hình thành rễ bị ức chế, số lượng rễ giảm (Hình $1f_4$, $1f_5$). Auxin ở nồng độ cao sẽ cảm ứng sự phân chia của tế bào thực vật để tạo thành mô sẹo do đó ức chế quá trình tạo rễ (Torres, 1989). Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Tình và đồng tác giả (2017) khi bổ sung 0,5 mg/L NAA vào môi trường nuôi cấy *P. vietnamense* cho thấy tỷ lệ tạo rễ là 88,89%. Hong và đồng tác giả (2008) cho rằng sự hình thành và phát triển rễ *Paphiopedilum* Alma Gevaert tốt nhất trên môi trường nuôi cấy bổ sung 5 mg/L NAA. Theo nghiên cứu của Kumar (2018) trên loài *P. villosum*, môi trường bổ sung 0,25 mg/L BA kết hợp với 0,5 mg/L NAA là môi trường tốt nhất cho hình thành và sinh trưởng của rễ. Nồng độ NAA được sử dụng trong nhân giống *in vitro* ở những loài khác nhau là khác nhau, có loài thích hợp ở nồng độ thấp nhưng cũng có loài thích hợp ở nồng độ cao. Như vậy, môi trường nuôi cấy ½ MS bổ sung 1 mg/L NAA là thích hợp cho quá trình tái sinh rễ *in vitro* chồi lan Hài Đà Lạt.

Bảng 3. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng tái sinh rễ của chồi lan Hài Đà Lạt nuôi cấy *in vitro.*

NT	Số lá/chồi	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)	% tạo rễ
ĐC	3,20	2,30	1,82	70
NT1: 0,5 mg/L NAA	4,20	3,50	2,46	100
NT2: 1,0 mg/L NAA	5,20	4,60	3,56	100
NT3: 1,5 mg/L NAA	5,00	3,20	4,10	98
NT4: 2,0 mg/L NAA	4,80	2,80	3,20	87
$LSD_{0.05}$	0,29	0,36	0,92	
CV (%)	3,50	5,90	1,60	

Ảnh hưởng của acid humic lên quá trình ra rễ của chồi lan Hài Đà Lạt nuôi cấy *in vitro*

Acid humic là thành phần hữu cơ quan trọng của đất, ảnh hưởng tới sự phát sinh hình thái và sinh lý ở thực vật bậc cao (Nardi *et al*., 2002; Eyheraguibel *et al*., 2008). Acid humic có thể tác động trực tiếp lên màng tế bào thực vật, tăng tính thấm và giúp thành phần khoáng di chuyển qua lại trên màng (Dhanapal, Sekar, 2014). Chúng được sử dụng giúp tăng tỷ lệ nảy mầm, hỗ trợ tốt cho sự phát triển của rễ (Gallant, 2004). Điều đặc biệt, acid humic có hoạt tính kháng khuẩn bằng cách ức chế sự phát triển của vi khuẩn và nấm, do đó làm giảm độc tố nấm mốc (Islam *et al*., 2005). Facanha và đồng tác giả (2002) cho rằng acid humic được phân lập từ giun đất giúp tăng cường sự kéo dài rễ, xuất hiện rễ bên và hoạt tính enzyme H^+ ATPase trong màng nguyên sinh chất của rễ ngô. Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, acid humic được sử dụng là hormone tăng trưởng (Dhanapa, Sekar, 2013). Môi trường ½ MS bổ sung acid humic (nồng độ 0,1 - 0,5%) trong quá trình tạo rễ *in vitro* loài *Musa accuminata*, kết quả cho thấy rễ phát triển tốt sau 21 ngày nuôi cấy.



Hình 1. Nhân giống *in vitro* lan Hài Đà Lạt. a. Cây lan Hài Đà Lạt; b. Chồi *in vitro;* c. Tạo chồi trên môi trường nền MS (ĐC); d. Tạo chồi khi bổ sung 100 mg/L chuối và 100 mg/L khoai tây; e. Tạo chồi khi bổ sung 1 mg/L peptone; f. Ảnh hưởng của NAA đến sự tạo rễ *in vitro;* g. Ảnh hưởng của acid humic đến sự hình thành rễ; h. Cây con ngoài vườn ươm sau 60 ngày.

Bảng 4. Ảnh hưởng của acid humic lên quá trình ra rễ của chồi lan Hài Đà Lạt nuôi cấy *in vitro.*

NT	Số lá/chồi	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ	% tạo rễ
ĐC	3,20	2,30	1,82	70
NT1: 0,5 mg/l	4,80	3,80	3,10	88
NT2: 1 mg/l	5,00	4,10	4,25	100
NT3: 1,5 mg/l	5,00	4,30	4,20	100
NT4: 2 mg/l	5,30	5,00	5,50	100
NT5: 2,5 mg/l	5,00	4,00	4,80	100
$LSD_{0.05}$	0,25	0,34	0,84	
CV (%)	3,00	4,80	1,20	

Chồi lan Hài Đà Lạt được cấy trong môi trường ½ MS có bổ sung acid humic sau 60 ngày nuôi cấy, kết quả trên Bảng 4 cho thấy, acid humic tác động mạnh lên sự tạo rễ *in vitro* lan Hài Đà Lạt. Khi nồng độ acid humic tăng thì số rễ, chiều dài rễ và phần trăm chồi tạo rễ tăng vượt trội so với đối chứng. Đặc biệt, khi môi trường nuôi cấy bổ sung 2 mg/L acid humic (NT4) cho kết quả tối ưu về các chỉ tiêu theo dõi với trung bình chiều dài rễ đạt 5,5 cm, 5,3 lá/chồi, 5 rễ/chồi và 100% chồi tạo rễ, xung quanh rễ có một lớp mô hút ẩm dày, màu xám bạc, chóp rễ có màu xanh thuận lợi cho sự phát triển của cây con *in vitro* giai đoạn ngoài vườn ươm (Hình $1g_5$). Ngoài ra, khi bổ sung acid humic ở nồng độ 1,5; 2; 2,5 mg/L (NT3, NT4, NT5) cho chất lượng cây con tốt với lá xanh đậm, phát sinh một số chồi mới. Đây là hiện tượng hiếm gặp ở lan Hài và có thể là hướng mới trong quá trình nhân giống lan Hài ở các nghiên cứu tiếp theo. Mohanmed và đồng tác giả (2017) khi nghiên cứu nhân giống loài Đỗ Quyên thu được kết quả môi trường ra rễ tối ưu khi bổ sung 1 mg/L acid humic. Esmaeil và đồng tác giả (2015) cũng đã bổ sung 500 mg/L acid humic vào môi trường ra rễ trên đối tượng *Lilium ledebourii*. Như vậy, môi trường nuôi cấy ½ MS bổ sung 2 mg/L acid humic thích hợp cho quá trình tái sinh rễ *in vitro* loài lan Hài Đà Lạt.

KẾT LUẬN

Môi trường thích hợp cho sự hình thành và phát triển chồi *in vitro* loài lan Hài Đà Lạt là môi trường nuôi cấy MS bổ sung 100 g/L chuối kết hợp với 100 g/L khoai tây hoặc môi trường nuôi cấy MS bổ sung 1 g/L peptone. Môi trường thích hợp cho sự tạo rễ *in vitro* là môi trường nuôi cấy ½ MS bổ sung 0,5 mg/L NAA hoặc bổ sung 2 mg/L acid humic.

Lời cảm ơn: *Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; Chương trình Tây Nguyên 2016-2020, Đề tài mã số TN18/T08 đã hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu này.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aktar S, Nasiruddin KM, Hossain K (2008) Effects of different media and organic additives interaction on *in vitro* regeneration of Dendrobium orchid. *J Agr Rural Dev* 6: 69-74.

Anupan K, Santi W, Kanokorn S (2016) Influence of organic supplements on growth and development of *in vitro* shoots of *Bulbophyllum dhaninivatii* Seidenf. *Appl Mech Mater* 855: 42-46.

Averyanov LV (2001) New natural interspecific hybrid – *Paphiopedilum x dalatense* from Vietnam. *Orchid Dig* 65(3): 133-134.

Averyanov LV, Phillip C, Loc PK, Hiep NT (2004) *Lan hài Việt Nam với phần giới thiệu về hệ thực vật Việt Nam.* Nhà xuất bản Giao thông vận tải.

Chyuam YN, Norihan MS, Faridah QZ (2010) *In vitro* multiplication of the rare and endangered slipper orchid, *Paphiopedilum rothschildianum* (Orchidaceae). *Af J Biotech* 9(14): 2062-2068.

Dhanapal S, Sathish SD (2013) Humic acids and its

role in plant tissue culture at low nutrient level. *JAIR* 2(6): 338-340.

Dhanapal S, Sathish SD (2014) Antioxidant potential of coal extracted humic acid on *in-vitro* propagation of *Musa accuminata*: a comparison study with humic rooting and keradix. *IJIRSET* 3(6): 13649-13657.

Dhanapal S, Sathish SD (2014) Enhanced *in vitro* propagation of *Musa accuminata* induced by humic acid from coal extract as compared with commercially available humic acid products. *IJIRSET* 3(7): 300-307.

Đặng Thị Thắm, H'Yon Niê Bing, Nguyễn Thị Thanh Hằng, Đinh Văn Khiêm, Nông Văn Duy, Trần Thái Vinh, Quách Văn Hợi, Vũ Kim Công (2018) Vi nhân giống lan Nhất Điểm Hoàng (*Dendrobium heterocarpum* Lindl.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 16(1): 127-135.

Esmaeil C, Sakineh KG, Mehdi M, Alireza G (2015) The effect of zinc oxide nano particles and humic acid on morphological characters and secondary metabolite production in *Lilium ledebourii* Bioss. *IJGPB* 4(2): 11-19.

Eyheraguibel B, Silvestre J, Morard P (2008) Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. *Bioresour Technol* 99: 4206-4212.

Facanha AR, Canellas LP, Olivares FL, Anna LO (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence and plasma membrane H+ -ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol* 130: 1951-1957.

Gallant A (2004) Biostimulants: What they are and how they work. *Turf & Rec* 1-4.

Hong PI, Chen JT, Chang WC (2008) Plant regeneration *via* protocorm-like body formation and shoot multiplication from seed derived callus of a Maudiae type slipper orchid. *Acta physiol Plant* 30(5): 755-759.

Islam KMS, Schuhmacher A, Gropp JM (2005) Humic acid substances in animal agriculture. *Pak J Nutrit* 4(3): 126-134.

Islam MO, Matsui S, Ichihashi S (2000) Effect of complex organic additives on seed germination and carotenoid content in *Cattleya* seedlings. *Lindleyana* 15(2): 81-88.

Mohamed MAH, Alsadon AA, Al Mohaidib MS (2010) Corn and potato starch as an agar alternative for *Solanum tuberosum* micropropagation. *Afr J Biotechnol* 9(1): 12-16.

Mohamed SE, Hong Z, Yan C, Bing L, Yiping X (2017) The effect of Humic acid on endogenous hormone levels and antioxidant enzyme activity during *in vitro* rooting of evergreen *Azalea*. *Sci Hort* 227: 234-243.

Murashige T, Skoog F (1962) Areivsed medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Plant Physiol* 15: 473-497.

Nardi S, Diego P, Adele M, Angelo V (2002) Physiological effects of Humic substances on higher plants. *Soil Biol Biochem* 34: 1527-1536.

Norhayati D, Rosna MT, Nor NMN, Hasimah A (2011) Provision of low cost media options for *in vitro* culture of *Celosia* sp. *Afr J Biotechl* 10(80): 18349-18355.

Nguyễn Đức Lượng, Lê Thị Thủy Tiên (2006) *Công nghệ tế bào*. NXB Đại học Quốc gia TPHCM.

Pierik RLM (1988) *In vitro* culture of higher plants as a tool in the propagation of horticultural crops. *Acta Hortic* 226: 25-40.

Phùng Văn Phê, Nguyễn Thị Hồng Gấm, Nguyễn Trung Thành (2010) Nghiên cứu kỹ thuật nhân nhanh chồi *in vitro* loài Lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii*. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 26: 248-253.

Raj K, Mridul C, Ngursanzuala S, Tshering CB, Singh DR (2018) Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Paphiopedilum villosum* (Lindl.) Stein, a valuable and vulnerable lady's slipper orchid from India. *Curr Sci* 114(2): 266-269.

Saranjeet K, Kamlesh KB (2012) Oranic growth supplement stimulants for *in vitro* multiplication of *Cymbidium pendulum* (Roxb.) Sw. *Hort Sci (Prague)* 39(1): 47-52.

Songjun Z, Kunlin W, Jaime ATS, Jianxia Z, Zhilin C, Nianhe X, Jun D (2012) Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh, an endangered terrestrial orchid. *Sci Hort* 138: 198-209.

Tinh TN, Dung TN, Thanh XD, Dat TC, Binh XN (2017) *In vitro* propagation of a Vietnam endemic lady's slipper orchid (*Paphiopedilum vietnamense* O.Gruss & Perner). *J Hortic Res* (1): 1-8.Torres KC (1989) *Tissue culture technique for horticultural*

crops. Chapman and Hall New York – London, America 284.

Vũ Quốc Luận, Trịnh Thị Hương, Nguyễn Phúc Huy, Đỗ Khắc Thịnh, Dương Tấn Nhựt (2014) Ảnh hưởng của các chất bổ sung hữu cơ lên quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi lan Vân hài (*Paphiopedilum callosum*) nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 52(1): 51-64.

Yu JL, Yu CT, Yung WS, Ruey SL, Fang SW (2011) *In vitro* shoot induction and plant regeneration from flower buds in *Paphiopedilum* orchids. *In vitro Cell Dev Biol Plants* 47: 702-709.

MICROPROPAGATION OF *PAPHIOPEDILUM X DALATENSE*

Tran Thai Vinh, H' Yon Nie Bing, Dang Thi Tham, Nguyen Thi Thanh Hang, Vu Kim Cong, Nong Van Duy

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

SUMMARY

Paphiopedilum x dalatense is a beautiful orchid species with large flowers in variable colors and leaves covered with stripes and beautiful unseen mosaic spots. Recently, many people exploit this species, causing it becomes very rare. In this study, we studied the effects of various organic matter: potato, banana and tryptone, yeast powder, peptone on the growth and development of *P. dalatense* shoots as well as the effects of NAA and humic acid on *in vitro* rooting of this orchid were investigated. The research results showed that MS medium supplemented with 100 g/L banana in combination with 100 g/L potato (5,4 shoots/sample, 18,8 mm/shoot, 4,5 leaves/shoot, and shoots survival rate of 100%) or MS medium supplemented with 1 g/L peptone (4,19 shoots/sample, 15 mm/shoot, 4 leaves/bud, and 92% of shoots survival rate) were the best response for the shoot formation and development. In addition, the half strength MS culture medium supplemented with 1 mg/L NAA (5,2 leaves/sample, 4,6 roots/buds, 3,56 cm/root, and 100% rate for rooting) was the suitable medium for the *in vitro* rooting of *P. dalatense*. Being cultured on half strength MS medium supplemented with 2 mg/L humic acid, the rooting rate reached 100% with the greatest root number and the longest root (5 roots/shoots, 5,5 cm/root). The obtained results on the *in vitro* propagation on this orchid helps contribute to the conservation and increases the genotic pool of this precious wild orchid species, as well as the rapid multiplication of healthy plantlets serving the commercialization of precious orchid species.

Keywords: *Conservation, in vitro, humic acid, Paphiopedilum, Paphiopedilum x dalatense.*