

TÁI SINH CHỒI *IN VITRO* TỪ MẪU CÂY PHÁT HOA CỦA GIỐNG LAN HÀI PHẮC ĐỎ (*Phragmipedium Memoria* Dick Clements) NHẬP NỘI

Vũ Quốc Luận^{1*}, Đỗ Mạnh Cường¹, Nguyễn Thị Như Mai¹, Nguyễn Thị Kim Linh¹, Tạ Đình Vương¹, Trần Thị Tâm², Vũ Thị Tu², Nguyễn Ngọc Sơn³, Dương Tấn Nhựt¹

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên

²Trường Đại học Yersin Đà Lạt

³Trường Cao đẳng Đà Lạt

TÓM TẮT

Cây lan hài Phắc đỏ (*Phragmipedium Memoria* Dick Clements) là con lai giữa hai loài *Phragmipedium sargentianum* và *Phragmipedium besseae*. Nhân giống *in vitro* được xem là phương pháp hiệu quả để bảo tồn các giống cây đặc hữu và có giá trị kinh tế cao. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thành công trong việc tái sinh chồi *in vitro* từ mẫu cây phát hoa của cây lan hài Phắc đỏ nhập nội. Kết quả cho thấy, mẫu cây ở vị trí số 1 có tỷ lệ tái sinh cao nhất với 31,66%, số chồi hình thành là 4,00 chồi/mẫu, chiều cao chồi trung bình là 3,86 cm và khối lượng tươi là 1,03 g/cụm trên môi trường ½ MS bổ sung 2 mg/L BA, 9 g/L agar, 30 g/L đường và 1 g/L than hoạt tính. Mẫu cây được đâm 3 vết thương ở góc cho kết quả tái sinh chồi bền tốt nhất, cụm chồi sinh trưởng cân đối với số chồi hình thành cao nhất là 6,66 chồi/mẫu, chiều cao trung bình là 4,60 cm và khối lượng tươi là 2,33 g/cụm thu được trên môi trường ½ MS có bổ sung 2,0 mg/L BA, 0,5 mg/L NAA, 9 g/L agar, 30 g/L đường và 1 g/L than hoạt tính. Khả năng ra rễ và tạo cây con hoàn chỉnh trên môi trường ½ MS bổ sung 0,5 mg/L NAA, 0,5 mg/L BA, 9 g/L agar, 30 g/L đường và 1 g/L than hoạt tính cho kết quả sinh trưởng tốt nhất về chiều cao chồi (5,46 cm), số rễ (5,00 rễ/cây), chiều dài rễ (4,20 cm) và khối lượng tươi (0,72 g).

Từ khóa: lan hài Phắc đỏ, mẫu cây phát hoa, tái sinh chồi, vị trí mẫu cây, vết thương.

GIỚI THIỆU

Chi lan hài Phắc (*Phragmipedium*) thuộc phân họ (*Cypripedioideae* Lindl.). Chúng phân bố chủ yếu ở khu vực Nam Mỹ và đang bị đe dọa nghiêm trọng do sự khai thác quá mức và môi trường sống bị thay đổi (Dressler, 2003). Chi này có khoảng 23 loài và hầu hết các loài thuộc chi này đều sống trên cạn, biểu sinh hoặc sống trên đá. Thân cây thiếu giả hành và chiều cao có thể đạt đến 80 cm với lá dài và hẹp. Cánh hoa thường có từ 2 đến 10 hoa với cánh hoa dài giống như ria mép, môi lớn giống như những chiếc hải (David Banks, 2018). Cây lan hài Phắc đỏ (*Phragmipedium Memoria* Dick Clements) là con lai giữa 2 loài (*Phragmipedium sargentianum* × *Phragmipedium besseae*). Cây trưởng thành có chiều cao khoảng 30 - 40 cm, chiều rộng lá 2 - 3 cm, phát hoa thường mang từ 3 - 5 hoa màu đỏ tươi và nở nối tiếp nhau, cánh hoa hình bầu dục với chiều dài từ 3 - 4 cm và chiều rộng từ 1,5 - 2 cm, lá đai lưng thon nhọn ở đầu với chiều dài từ 2,5 - 3 cm và chiều rộng từ 1,2 - 1,5 cm, môi có cấu trúc giống như một chiếc hải với chiều dài từ 2 - 2,5 cm và chiều rộng từ 1,5 - 2 cm (Hình 1a). Chúng được nhập nội vào Việt Nam theo con đường tiểu ngạch từ các nghệ nhân trồng hoa lan vào khoảng 30 năm trở lại đây. Việc xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* được xem là một phương pháp tiếp cận hiệu quả cho việc bảo tồn *ex situ* các loài lan có nguy cơ tuyệt chủng (Sarasan *et al.*, 2006). Nhân giống *in vitro* thuộc chi lan hài Phắc cho đến nay chúng tôi mới chỉ ghi nhận được 1 công bố về sử dụng phương pháp gieo hạt được thực hiện thành công trên 3 giống *Phragmipedium humboldtii*, *Phragmipedium longifolium* và *Phragmipedium pearcei* (Melania, Víctor, 2008). Hai vấn đề chính góp phần vào việc nhân giống *in vitro* không thành công là do các loài thuộc chi lan hài Phắc được xếp vào các loài thực vật khó cảm ứng tái sinh trong nuôi cấy *in vitro* (Arditti, Ernst 1993), cây sinh trưởng trong điều kiện ẩm thấp nên rất khó thu được các mẫu cây vô trùng thông qua các bước khử trùng bề mặt thông thường (Chugh *et al.*, 2009). Sử dụng phát hoa làm nguồn vật liệu nuôi cấy ban đầu cũng đã thành công trên một số giống hoa lan như lan Hồ Điệp và lan *Dendrobium*. Trên chi lan Hài (*Paphiopedilum*), việc sử dụng mẫu cây phát hoa làm nguồn vật liệu tái sinh cũng thu được kết quả còn rất khiêm tốn, cho đến nay, chỉ mới thu được trên 3 giống cho cảm ứng tái sinh từ mẫu cây phát hoa (Liao *et al.*, 2011). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu quá trình tái sinh chồi từ nguồn mẫu cây phát hoa nhằm tạo ra số lượng lớn cây giống đồng đều và khoẻ mạnh nhằm phục vụ cho nhu cầu trồng hoa lan trong cả nước.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Vật liệu nghiên cứu được sử dụng là những phát hoa còn non được hình thành sau 2 tháng với chiều dài khoảng 25 - 30 cm của những cây lan hài Phắc đỏ trưởng thành được nuôi trồng tại vườn ươm của Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên. Phát hoa được thu nhận từ tháng 12 năm 2023 và cắt thành từng đốt và phân thành 3 vị trí mẫu cây khác nhau (1, 2, 3) (Hình 1b) với chiều dài 3 cm được rửa bề mặt bằng nước xà phòng loãng và để

dưới vòi nước chảy nhẹ trong 60 phút để loại bỏ bụi bẩn trên bề mặt của mẫu cấy. Tiếp theo, mẫu cấy được khử trùng bằng cồn 70% trong 1 phút và khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% trong 7 phút và được rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy ½ MS (Murashige, Skoog, 1962) có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng (BA, TDZ, NAA, IBA) với nồng độ khác nhau tùy theo từng mục đích thí nghiệm.

Điều kiện nuôi cấy *in vitro*

Tất cả các nghiệm thức trong thí nghiệm được đặt dưới điều kiện ánh sáng đèn huỳnh quang với cường độ chiếu sáng 45 μmol.m⁻²s⁻¹. Thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, nhiệt độ 25±2°C, độ ẩm phòng 50-60%.

Phương pháp

Ảnh hưởng của vị trí mẫu cấy phát hoa lên khả năng tái sinh chồi *in vitro*

Mẫu cấy sau khi được khử trùng và cắt bỏ hai đầu (0,5 cm) để loại bỏ phần tế bào bị chết và được cấy lên môi trường ½ MS có bổ sung 2 mg/L BA, 9 g/L agar, 30 g/L đường, 1 g/L than hoạt tính, pH=5,8 (Liao *et al.*, 2011).

Ảnh hưởng của số lần gây vết thương và kết hợp với chất điều hòa sinh trưởng lên sự tái sinh chồi bên

Chồi non *in vitro* với chiều cao 2,5 cm được gây vết thương bằng mũi kim nhọn có đường kính 1 mm, sau khi mũi kim được khử trùng, dùng mũi kim châm vào khu vực gốc của mẫu cấy từ 1 - 4 lần để gây ra các vết thương. Chất điều hòa sinh trưởng để dàng xâm nhập vào bên trong mẫu cấy thông qua vết thương nhằm kích thích sự phát triển của chồi bên (Nhut *et al.*, 2005).

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên quá tạo cây hoàn chỉnh

Chồi non có chiều cao trung bình 2,5 cm được xử lý ra rễ và tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường ½ MS có bổ sung 9,0 g/L agar, 30 g/L đường, 1,0 g/L than hoạt tính, pH=5,8 và kết hợp với các nồng độ chất điều hòa sinh trưởng khác nhau.

Phương pháp bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên 1 yếu tố, 3 lần lặp lại. Thí nghiệm ảnh hưởng của vị trí mẫu cấy được thực hiện ở mỗi vị trí 20 mẫu cấy với 1 mẫu cấy/bình. Thí nghiệm ảnh hưởng của số lần gây vết thương và tạo cây hoàn chỉnh được thực hiện với 20 chồi với 5 chồi/bình. Số liệu của các thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm thống kê SPSS (phiên bản 16.0) theo phương pháp Duncan's test (Duncan, 1955), mức độ tin cậy P < 0,05.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của vị trí mẫu cấy phát hoa lên khả năng tái sinh chồi *in vitro*

Khả năng tái sinh chồi từ các vị trí khác nhau của phát hoa sau 90 ngày nuôi cấy được thể hiện qua Bảng 1. Kết quả cho thấy, ở vị trí số 1, tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất đạt 31,66% với số chồi hình thành 4,00 chồi/mẫu (Hình 1c. 1). Tỷ lệ tái sinh chồi ở vị trí số 2 cho khả năng tái sinh thấp hơn đạt 21,66% với số chồi hình thành 3,33 chồi/mẫu và ở vị trí số 3, tỷ lệ tái sinh chồi thấp nhất 13,33% với số chồi hình thành 1 chồi/mẫu (Hình 1c. 2, 3). Cụm chồi hình thành ở vị trí 1 cho chất lượng tốt nhất thông qua khối lượng tươi trung bình 1,03 g/cụm, chồi sinh trưởng và phát triển đồng đều với chiều cao trung bình đạt 3,86 cm/chồi (Hình 1c. 1, Bảng 1). Trong khi đó, chất lượng chồi hình có xu hướng giảm ở vị trí số 2 và thấp nhất ở vị trí số 3 (Hình 1c. 2, 3; Bảng 1). Cho đến nay, nhân giống vô tính trên nhóm lan hài nói chung luôn là một thách thức lớn đối với những nhà nghiên cứu trong lĩnh vực nuôi cấy mô tế bào thực vật. Nhân giống trên chi lan hài Phác chúng tôi chỉ mới ghi nhận 1 công bố về sử dụng phương pháp gieo hạt được thực hiện trên 3 giống (*Phragmipedium humboldtii*, *Phragmipedium longifolium* và *Phragmipedium pearcei*) với tỷ lệ nảy mầm đạt tương ứng (44,7%, 82,3%, 34,3%) (Melania Víctor, 2008). Sử dụng nguồn mẫu cấy phát hoa làm nguồn vật liệu tái sinh trong nuôi cấy *in vitro* đã thành công trên một số giống hoa lan như lan. Trên chi lan Hài (*Paphiopedilum*), sử dụng mẫu phát hoa làm nguồn vật liệu tái sinh cũng thu được kết quả còn rất khiêm tốn, cho đến nay, chỉ mới thu được trên 3 giống cho cảm ứng tái sinh từ mẫu cấy phát hoa (Liao *et al.*, 2011). Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, trên chi lan hài Phác, đây là báo cáo đầu tiên sử dụng nguồn mẫu phát hoa làm vật liệu tái sinh chồi thành công trong nuôi cấy *in vitro*.

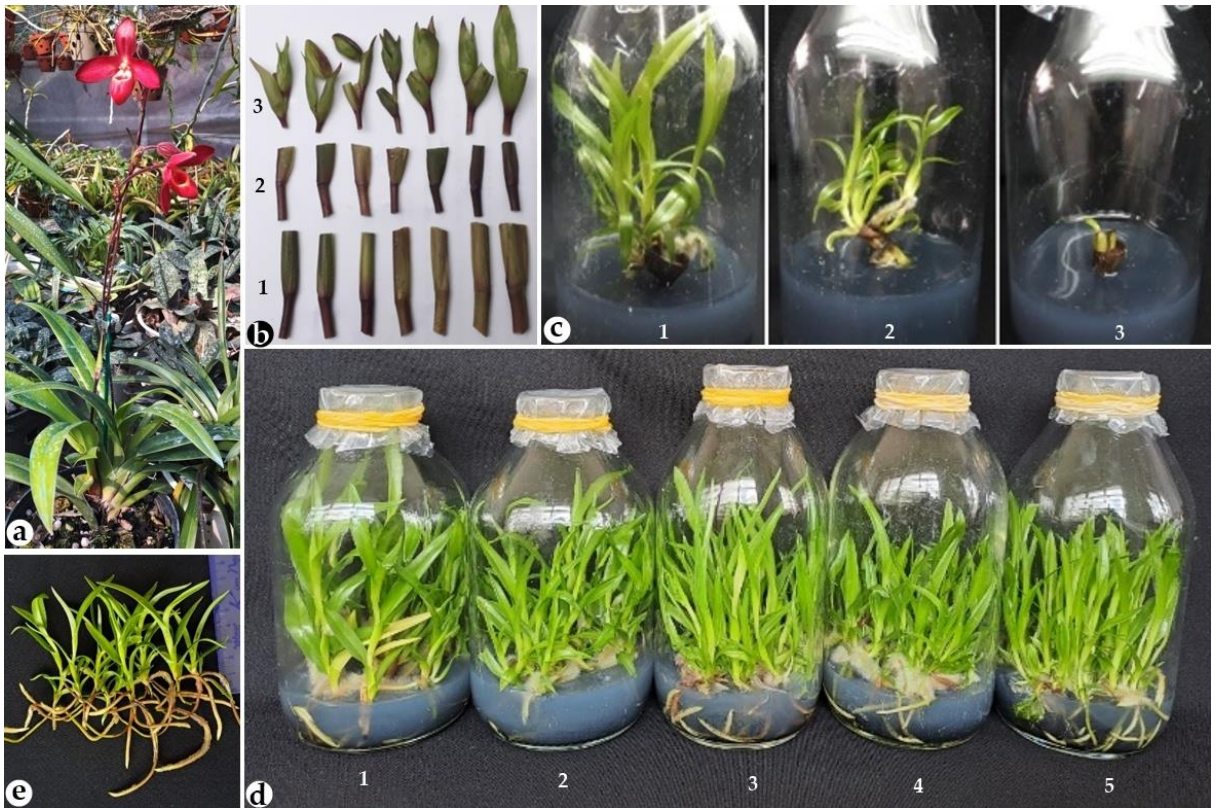
Bảng 1. Ảnh hưởng của vị trí mẫu cấy lên khả năng tái sinh chồi ngủ của mẫu cấy phát hoa sau 90 ngày nuôi cấy

Vị trí mẫu cấy	Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Khối lượng tươi/cụm chồi (g)
1	31,66 ^a	4,00 ^a	3,86 ^a	1,03 ^a
2	21,66 ^b	3,33 ^a	2,96 ^b	0,66 ^b
3	13,33 ^c	1,00 ^b	0,76 ^c	0,13 ^c

Chú thích: những mẫu tự khác nhau (a,b,c...) được nêu trong cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa với P < 0,05 trong phép thử Duncan.

Ảnh hưởng của số lần gây vết thương và kết hợp với chất điều hòa sinh trưởng lên sự tái sinh chồi bên

Mẫu cây bị tổn thương có ảnh hưởng tích cực lên quá trình hình thành chồi bên được thể hiện qua Bảng 2. Khi số vết thương được tạo ra xung quanh gốc gia tăng từ 1 tới 4 lần cho thấy số chồi bên cũng tăng theo trên cả hai môi trường có bổ sung BA, TDZ riêng lẻ hoặc kết hợp với NAA (Bảng 2). Trên môi trường chỉ bổ sung BA và TDZ cho thấy, cụm chồi hình thành không đều nhau, chiều cao giữa các chồi trong 1 cụm có sự chênh lệch khá rõ rệt (Hình 1d, 2, 4). Chiều cao chồi tốt nhất thu được trên mẫu cây đối chứng và chiều cao chồi có xu hướng giảm khi số chồi/cụm tăng lên (Bảng 2). Điều này cho thấy, khi chồi đỉnh bị tổn thương đã kích thích sự phát triển của chồi bên, sự cạnh tranh về dinh dưỡng, ánh sáng và khoáng trong bình nuôi cấy bị giới hạn là nguyên nhân dẫn đến chiều cao chồi trung bình có xu hướng giảm (Bảng 2). Trong khi đó, trên môi trường có bổ sung BA, TDZ kết hợp với NAA cho thấy cụm chồi phát triển khoẻ mạnh và đồng đều hơn về chiều cao chồi thu được trên tất cả các nồng độ phối hợp. Mẫu cây bị gây vết 3 thương ở khu vực gốc cho khả năng tái sinh chồi bên cao nhất đạt từ 6,33 - 6,66 chồi/mẫu thu được trên môi trường có bổ sung 0,4 mg/L TDZ + 0,5 mg/L NAA hoặc 2,0 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA (Hình 1d, 3, 5; Bảng 2). Khối lượng tươi thu được trên tất cả các mẫu cây bị gây vết thương đều có chiều hướng gia tăng và đạt cao nhất 2,33 g/cụm khi mẫu cây bị gây 3 vết thương trên môi trường có bổ sung 2,0 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA. Phương pháp gây vết thương trên đối tượng lan hài Hồng cho hệ số nhân chồi cao thông qua kích thích sự phát triển của chồi bên (Nhut *et al.*, 2005). Trên đối tượng lan hài Hồng, hải Vân và hải Tam Đảo cũng cho thấy, phương pháp gây vết thương và huỷ đỉnh đã làm tổn thương sự phát triển của chồi chính, dẫn đến sự kích thích tái sinh của chồi bên (Luan *et al.*, 2019). Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, gây 3 vết thương ở phần gốc của mẫu cây kết hợp với môi trường ½ MS có bổ sung 2,0 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA cho hệ số nhân chồi cao nhất đạt 6,66 chồi/mẫu, chiều cao chồi đạt 4,60 cm và khối lượng tươi đạt 2,33 g/cụm chồi. Cụm chồi sinh trưởng và phát triển đồng đều là điều kiện thuận lợi cho việc tạo cây hoàn chỉnh ở giai đoạn tiếp theo.



Hình 1. Các bước nhân giống cây lan hải Phác đồ nhập nội

a. Cây lan hải Phác đồ trưởng thành sinh trưởng và phát triển ngoài vườn ươm. **b.** Phát hoa được thu nhận và cắt thành từng đốt với chiều dài 3 cm và được phân thành 3 vị trí mẫu cây, 1. Vị trí gốc của phát hoa, 2. vị trí giữa, 3. Vị trí ngọn của phát hoa. **c.** Chồi tái sinh trên 3 vị trí mẫu cây khác nhau, 1. Vị trí gốc, 2. vị trí giữa, 3. Vị trí ngọn. **d.** Cụm chồi hình thành từ các mẫu cây được gây 3 vết thương ở phần gốc, 1. Đối chứng không gây vết thương, 2. Cụm chồi hình thành trên môi trường có bổ sung 2 mg/L BA, 3. Cụm chồi hình thành trên môi trường có bổ sung 2 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA, 4. Cụm chồi hình thành trên môi trường có bổ sung 0,4 mg/L TDZ, 5. Cụm chồi hình thành trên môi trường có bổ sung 0,4 mg/L TDZ + 0,5 mg/L NAA. **e.** Ra rễ và tạo cây con hoàn chỉnh trên môi trường có bổ sung 0,5 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA.

Bảng 2. Ảnh hưởng của số lần gây vết thương và kết hợp với chất điều hòa sinh trưởng lên sự tái sinh chồi bên sau 90 ngày nuôi cấy

Số lần gây vết thương	Chất điều hòa sinh trưởng (mg/L)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Khối lượng tươi/cụm chồi (g)
0	2,0 mg/L BA	1,66 ^g	6,06 ^a	1,10 ^j
1		2,66 ^{fg}	5,60 ^c	1,23 ⁱ
2		3,66 ^{ef}	5,03 ^f	1,53 ^{gh}
3		5,00 ^{bcd}	4,03 ^h	1,63 ^{fg}
4		4,66 ^{cde}	4,00 ^h	1,33 ⁱ
1	2,0 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA	3,00 ^f	5,50 ^{cd}	1,50 ^h
2		4,66 ^{cde}	5,36 ^{de}	1,76 ^{de}
3		6,66^a	4,60^g	2,33^a
4		6,00 ^{ab}	4,43 ^{gh}	2,06 ^c
0	0,4 mg/L TDZ	1,66 ^g	5,83 ^b	0,96 ^k
1		3,00 ^f	5,36 ^{de}	1,33 ⁱ
2		4,33 ^{de}	4,90 ^f	1,73 ^{def}
3		5,66 ^{abc}	4,56 ^g	2,13 ^{bc}
4		5,66 ^{abc}	4,33 ^h	2,03 ^c
1	0,4 mg/L TDZ + 0,5 mg/L NAA	3,66 ^{ef}	5,50 ^{cd}	1,66 ^{ef}
2		4,66 ^{cde}	5,20 ^e	1,83 ^d
3		6,33 ^a	4,53 ^g	2,23 ^{ab}
4		6,00 ^{ab}	4,26 ^h	2,13 ^{bc}

những mẫu tự khác nhau (a,b,c...) được nêu trong cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa với $P < 0,05$ trong phép thử Duncan.

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên quá tạo cây hoàn chỉnh

Các chồi tốt nhất ở thí nghiệm trên được thu nhận để cảm ứng hình thành rễ và tạo cây con hoàn chỉnh trên môi trường ½ MS có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật ở các nồng độ khác nhau. Sau 60 ngày nuôi cấy, kết quả cho thấy, khi gia tăng nồng độ NAA, IBA trong môi trường nuôi cấy đều dẫn đến sự gia tăng về các chỉ tiêu theo dõi so với đối chứng (Bảng 3). Khi bổ sung nồng độ NAA và IBA riêng lẻ từ 0,5 - 1,0 mg/L cho thấy có sự khác biệt về số rễ hình thành và chiều dài rễ. Trên môi trường cố định (0,5 mg/L NAA và IBA) và có bổ sung thêm (0,3 - 0,7 mg/L BA) cho thấy các chỉ tiêu theo dõi đều gia tăng so với đối chứng và môi trường có bổ sung NAA, IBA riêng lẻ. Kết quả tốt nhất về các chỉ tiêu theo dõi như chiều cao cây, số rễ, chiều dài rễ và khối lượng tươi thu được trên môi trường có bổ sung 0,5 mg/L NAA và 0,5 mg/L BA (Hình 1e., Bảng 3). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Nhut và đồng tác giả (2007) đã sử dụng môi trường có bổ sung 0,5 mg/L NAA và 0,5 mg/L BA cho quá trình ra rễ và tạo cây hoàn chỉnh trên giống lan hài Hồng. Trên môi trường đối chứng, chúng tôi nhận thấy vẫn có sự hình thành rễ, tuy nhiên số rễ hình thành ít và chiều dài rễ ngắn nên không phù hợp để đưa cây con ra điều kiện sinh trưởng tiếp theo ở giai đoạn vườn ươm. Paveena và đồng tác giả (2010) cũng cho thấy, môi trường MS chỉ bổ sung 50 g/L dịch chiết chuối, chồi vẫn hình thành rễ và tạo hoàn chỉnh sau 4 tháng nuôi cấy. Chyuan và đồng tác giả (2010) khi cấy chồi non trên môi trường MS chỉ bổ sung 1 - 2 g/L pepton vẫn có sự tạo rễ sau 12 tuần nuôi cấy. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, khi bổ sung NAA và IBA vào môi trường nuôi cấy đã gia tăng sự hình thành rễ trên giống lan hài Phác đỏ trong nuôi cấy *in vitro*. Tuy nhiên, nhằm nâng cao chất lượng cây giống *in vitro*, cần bổ sung thêm BA vào môi trường để cây con tiếp tục sinh trưởng, phát triển và môi trường ½ MS có bổ sung 0,5 mg/L NAA, 0,5 mg/L IBA cho chất lượng cây giống tốt nhất về các chỉ tiêu theo dõi như chiều cao cây đạt 5,46 cm, số rễ hình thành đạt 5,0 rễ/cây, chiều dài rễ đạt 4,20 cm và khối lượng tươi đạt 0,72 g/cây sau 60 ngày nuôi cấy.

Bảng 3. Ảnh hưởng của NAA, IBA riêng lẻ và kết hợp với BA lên quá trình tạo cây hoàn chỉnh sau 60 ngày nuôi cấy

NAA (mg/L)	IBA (mg/L)	BA (mg/L)	Chiều cao cây (cm)	Số rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi (g)
0			3,73 ^g	2,00 ^e	2,33 ^f	0,40 ^g
0,5			4,46 ^{ef}	3,66 ^d	3,50 ^{bcd}	0,53 ^{de}
1,0			4,36 ^{ef}	4,00 ^{bcd}	3,46 ^{bcd}	0,47 ^{ef}
1,5			4,33 ^{ef}	3,90 ^{cd}	3,40 ^{cde}	0,42 ^{fg}
	0,5		4,43 ^{ef}	4,00 ^{bcd}	3,30 ^{cde}	0,42 ^{fg}
	1,0		4,50 ^e	3,93 ^{cd}	3,23 ^{de}	0,45 ^{fg}
	1,5		4,33 ^{ef}	3,83 ^{cd}	3,00 ^e	0,43 ^{fg}
0,5		0,3	4,93 ^c	4,50 ^{abcd}	3,66 ^{bcd}	0,58 ^{cd}
		0,5	5,46^a	5,00^a	4,20^a	0,72^a
		0,7	5,43 ^a	4,66 ^{abc}	3,86 ^{ab}	0,65 ^b
	0,5	0,3	4,70 ^d	4,33 ^{abcd}	3,63 ^{bcd}	0,52 ^{de}
		0,5	5,00 ^{bc}	4,80 ^{abc}	3,70 ^{bc}	0,60 ^{bc}
		0,7	5,10 ^b	4,93 ^{ab}	3,70 ^{bc}	0,58 ^{cd}

những mẫu tự khác nhau (a,b,c...) được nêu trong cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa với $P < 0,05$ trong phép thử Duncan.

Kết Luận

Vị trí mẫu cấy khác nhau của mẫu cấy phát hoa cây lan hài Phác đồ cho khả năng tái sinh chồi hoàn toàn khác nhau. Vị trí mẫu cấy tái sinh chồi cao nhất thu được ở mẫu số 1 với tỷ lệ tái sinh là 31,66%, số chồi hình thành 4,00 chồi/mẫu với chiều cao chồi trung bình đạt 3,86 cm và khối lượng tươi trung bình là 1,03 g/cụm. Mẫu cấy được gây 3 vết thương ở phần gốc cho khả năng hình thành cụm chồi cao nhất, cụm chồi sinh trưởng và phát triển cân đối với số chồi hình thành (6,66 chồi/mẫu), chiều cao trung bình (4,60 cm) và khối lượng tươi (2,33 g/cụm) thu được trên môi trường ½ MS có bổ sung 2,0 mg/L BA, 0,5 mg/L, 9 g/L agar, 30 g/L đường và 1 g/L than hoạt tính. Khả năng ra rễ và tạo cây con hoàn chỉnh trên môi trường ½ MS bổ sung 0,5 mg/L NAA, 0,5 mg/L BA, 9 g/L agar, 30 g/L đường và 1 g/L than hoạt tính cho kết quả sinh trưởng tốt nhất về chiều cao cây đạt 5,46 cm, số rễ hình thành đạt 5,00 rễ/cây, chiều dài rễ đạt 4,20 cm và khối lượng tươi đạt 0,72 g/cây.

Lời cảm ơn: Tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

Arditti J and Ernst R (1993). Micropropagation of orchids. *John Wiley & Sons, New York, U.S.A*, 682p

Chugh S, Guha S, Rao IU (2009). Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Sci Hortic* 122: 507-520.

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.

David Banks (2018). The Australian Orchid Review, 83(5): 1-64.

Dressler RL (2003). Orchidaceae. In: Hammel BE, Grayum MH, Herrera C, Zamora N (eds.). Manual de plantas de Costa Rica, vol III: Monocotiledóneas (Orchidaceae-Zingiberaceae). *Missouri Botanical Garden. Saint Louis, Missouri, U.S.A*, 1-595.

Liao YJ, Tsai YC, Sun YW, Lin RS, Wu FS (2011). *In vitro* shoot induction and plant regeneration from flower buds in *Paphiopedilum* orchids. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 47:702-709.

Luan VQ, Cuong LK, Tung HT, Hien VT, Hieu T, Nhut DT (2019). Effects of shoot tip removal, wounding manipulation, and plant growth regulators on shoot regeneration and plantlet development in *Paphiopedilum* species. *Sci Hortic*, 256:108648.

Melania M and Víctor MJ (2008). Capsule development, in vitro germination and plantlet acclimatization in *Phragmipedium humboldtii*, *P. longifolium* and *P. pearcei*. *Lankesteriana*, 8(2): 23-31.

Nhut DT, Thuy DTT, Don NT, Luan VQ, Hai NT, TranThanh 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.

Nhut DT, Trang PTT, Vu NH, Thuy DTT, Khiem DV, Binh NV, Tran Thanh Van K (2005). A wounding method and liquid culture in *P. delenatii* propagation. *Prop Orn Plant*, 5(3): 158-163.

Paveena K, Supinya S, Kanchit T, Upatham M (2010). Plant regeneration through somatic embryogenesis from callus-derived PLBs of tropical slipper orchid (*Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz.). *Flor Orn Biotech*, 4: 29-35.

Sarasan V, Cripps R, Ramsay MM, Atherton C, McMichen M, Prendergast G, Rowntree JK (2006). Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade. *In Vitro Cell Devel Biol - Plant*, 42: 206-214.

IN VITRO REGENERATION SHOOTS FROM FLOWER BUDS EXPLANT OF IMPORTED RED *Phragmipedium Memoria* Dick Clements

Vu Quoc Luan^{1*}, Do Manh Cuong¹, Nguyen Thi Nhu Mai¹, Nguyen Thi Kim Linh¹, Ta Dinh Vuong¹, Tran Thi Tam², Vu Thi Tu², Nguyen Ngoc Son³, Duong Tan Nhut¹

¹Taynguyen Institute for Scientific Research, VAST, Dalat, 670000, Vietnam

²Yersin University

³Dalat College

SUMMARY

The red slipper orchid (*Phragmipedium Memoria* Dick Clements) is a hybrid between *Phragmipedium sargentianum* and *Phragmipedium besseae*. Micropropagation is considered an effective method to preserve endemic and economically valuable plant species. In this study, we successfully regenerated *in vitro* shoots from the inflorescence explants of the imported red slipper orchid (*Phragmipedium Memoria* Dick Clements). The study results showed that explant position number 1 had the highest regeneration rate at 31.66%, with 4.00 shoots formed per explant, an average shoot height was 3.86 cm, and fresh weight was 1.03 g/cluster on ½ MS medium supplemented with 2 mg/L BA, 9 g/L agar, 30 g/L sugar, and 1 g/L activated charcoal. Explants was stabbed 3 wounds at the shoot base demonstrated optimal results for lateral shoot regeneration. The shoot clusters developed uniformly with the highest average of shoots per explant was 6.66, average shoot height was 4.60 cm, and fresh weight was 2.33 g/cluster on medium ½ MS supplemented with 2.0 mg/L BA, 0.5 mg/L NAA, 9 g/L agar, 30 g/L sugar, and 1 g/L activated charcoal. Rooting and plantlet formation on ½ MS medium supplemented with 0.5 mg/L NAA, 0.5 mg/L BA, 9 g/L agar, 30 g/L sugar, and 1 g/L activated charcoal showed the best growth results in terms of shoot height (5.46 cm), number of roots (5.00), root length (4.20 cm), and fresh weight (0.72 g).

Keywords: Flower bud explants, position explant, regeneration shoots, the red slipper orchid, wounds.

* Author for correspondence: Tel: 0948013224; *Email: vuquocluan07@gmail.com