

Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự nảy mầm của hạt lan hài *Paphiopedilum dianthum*

- Phạm Văn Giáo
- Bùi Trang Việt

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 12 tháng 5 năm 2015, nhận đăng ngày 20 tháng 10 năm 2015)

TÓM TẮT

Môi trường có ảnh hưởng rất lớn đến sự nảy mầm của hạt. Trong nghiên cứu này, hạt lan hài 200 ngày tuổi được xử lý lạnh (5 ± 1 °C) và nuôi cấy trên môi trường MS ¼ có bổ sung GA₃ các nồng độ khác nhau, trong tối. Ở các điều kiện này, hạt bắt đầu trương nước ở ngày thứ 2, sau 1 tuần vỏ trở lên trong suốt, phôi xuất hiện cực đại ở tuần thứ 4 nhưng chưa thoát ra khỏi vỏ. Sự kết hợp

Từ khóa: chất điều hòa tăng trưởng thực vật, nảy mầm, *paphiopedilum dianthum*, protocorm, sự tạo chồi và rễ, sự tạo phôi.

của xử lý lạnh và GA₃ 0,001 mg/L kích thích mạnh sự phát triển phôi từ hạt. Chồi xuất hiện từ protocorm trên môi trường MS ¼ có bổ sung IAA 0,1 mg/L và BA 2,0 mg/L. Sự kết hợp IAA 2,0 mg/L với BA 0,1 mg/L giúp sự tạo rễ mạnh từ các chồi. Đặc biệt, sự gây vết thương trên protocorm màu trắng cho phép tạo cây con và rễ trên môi trường MS ¼ có bổ sung BA 2,0 mg/L.

MỞ ĐẦU

P. dianthum là loài lan quý, đang bị tuyệt chủng ngoài tự nhiên, và rất khó có thể phục hồi khi các quần xã thực vật tự nhiên bị con người phá hủy [1]. Trong tự nhiên, loài này xuất hiện ở đông nam Vân Nam, tây nam Quý Châu, tây Quảng Tây Trung Quốc và ở một số nơi ở phía bắc Việt Nam như Cao Bằng, Hà Giang, Hòa Bình, Lai Châu, Lào Cai, Sơn La [2]. *P. dianthum* là loài hoa đẹp, có giá trị kinh tế, sử dụng làm dược liệu, trang trí, xuất khẩu cùng nhiều mục đích khác nhưng việc lai tạo loài này còn gặp rất nhiều khó khăn, sự nảy mầm ngoài tự nhiên khó xảy ra, chỉ khoảng 15 – 17 % khi có sự cộng sinh của nấm *mycorrhizal* [3, 4]. Trong bài này, các môi trường được áp dụng nhằm làm tăng khả năng nảy mầm của *P. dianthum*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Hạt được lấy từ trái 200 ngày tuổi, ở giai đoạn hạt có khả năng nảy mầm, từ cây trồng tại Đà Lạt, Lâm Đồng, được dùng trong sự tạo phôi; phôi 12 tuần tuổi được dùng trong sự tạo protocorm; protocorm sau 4 tuần nuôi cấy được sử dụng trong sự tạo chồi; và chồi sau 40 tuần nuôi cấy được sử dụng trong thí nghiệm tạo rễ.

Phương pháp

Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển phôi lan hài

Thành phần môi trường: Hạt lan hài 200 ngày tuổi được nuôi trên các môi trường MS, MS ½, MS ¼ với agar 5,6 g/L (Merck) và pH 5,7 [4]. Khảo sát sự phát triển phôi và môi trường tốt nhất sau mỗi tuần nuôi cấy.

Ánh sáng: Hạt lan hài 200 ngày tuổi được nuôi trên môi trường MS $\frac{1}{4}$ với GA₃ nồng độ khác nhau [4], đối chứng là môi trường MS $\frac{1}{4}$. Khảo sát sự phát triển phôi và điều kiện ánh sáng sau mỗi tuần nuôi cấy.

Xử lý lạnh kết hợp với GA₃: Hạt lan hài 200 ngày tuổi được xử lý lạnh sau đó nuôi trên môi trường MS $\frac{1}{4}$ với GA₃ ở các nồng độ khác nhau, đối chứng là MS $\frac{1}{4}$. Xử lý lạnh được thực hiện bằng cách cho nang quả vào túi nhựa kín, ở 5 ± 1 °C. Khảo sát sự phát triển phôi và nồng độ GA₃ tốt nhất sau mỗi tuần nuôi cấy.

Hạt được nuôi trong điều kiện tối hoàn toàn 8 tuần, sau đó với ánh sáng 2500 ± 200 lux, 12 giờ/ngày, nhiệt độ 22 ± 1 °C. Mỗi thí nghiệm gồm 10 ống nghiệm với 3 lần lặp lại, theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi ống nghiệm chứa 100 ± 10 hạt.

Đo hoạt tính các chất điều hòa sinh trưởng thực vật

Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật được ly trích dựa vào sự thay đổi pH, cô lập trên bản mỏng sắc ký silica gel, và xác định hoạt tính dựa vào các sinh trắc nghiệm [5].

Khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự phát triển chồi.

Nồng độ BA, IAA, và GA₃: Phôi 12 tuần tuổi, được cấy chuyển sang môi trường có BA ở các nồng độ, riêng rẽ hay phối hợp với IAA 0,1 mg/L; môi trường có IAA 0,1 mg/L phối hợp với GA₃ ở các nồng độ khác nhau [4]; đối chứng là môi trường MS $\frac{1}{4}$. Khảo sát sự tạo chồi sau mỗi tuần nuôi cấy.

Nồng độ BA và sự gây vết thương: Protocorm màu trắng, giai đoạn 4 tuần tuổi được rạch nhẹ bằng dao cấy, mỗi lát rạch cách nhau khoảng 300 μm, sau đó đặt các protocorm mới rạch lên môi trường MS $\frac{1}{4}$ có bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau, đối chứng là protocorm không rạch và nuôi trên MS $\frac{1}{4}$ bổ sung BA 2,0

mg/L. Khảo sát sự tạo chồi sau mỗi tuần nuôi cấy.

Sự nuôi cấy tiền phôi và protocorm được thực hiện ở 22 ± 1 °C, cường độ ánh sáng 2500 ± 200 lux, 12 giờ/ngày. Mỗi thí nghiệm gồm 10 ống nghiệm với 3 lần lặp lại, theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi ống nghiệm có 10 protocorm.

Khảo sát sự tạo rễ và phát triển cây hoàn chỉnh từ chồi.

Chồi không rễ được cấy chuyển lên môi trường MS $\frac{1}{4}$ có bổ sung IAA ở các nồng độ riêng rẽ hoặc phối hợp với BA 0,1 mg/L [4]. Mẫu cấy được nuôi trong phòng tăng trưởng, cường độ ánh sáng 2500 ± 200 lux, 12 giờ/ngày, nhiệt độ 22 ± 1 °C. Mỗi thí nghiệm gồm 10 ống nghiệm với 3 lần lặp lại, theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi ống nghiệm chứa 4 chồi. Khảo sát sự hình thành rễ, sự xuất hiện chồi mới sau mỗi tuần nuôi cấy.

Quan sát hình thái giải phẫu.

Các mẫu cấy được cắt lát mỏng (bằng tay, bằng máy microtome), nhuộm mẫu bằng phẩm nhuộm hai màu (đỏ carmine, xanh iode) và quan sát dưới kính hiển vi quang học.

KẾT QUẢ

Ảnh hưởng của môi trường lên sự phát triển phôi lan hài.

Khi bắt đầu nuôi cấy, hạt ở trạng thái chưa phân hóa, kích thước trung bình 238,5 ± 6,3 μm chiều dài, 115,7 ± 1,3 μm chiều rộng (Hình 1), chứa một nhóm các tế bào gần như đẳng kính, với một lớp biểu bì rất rõ (Hình 2) và không có màu xanh điển hình khi nhuộm với I₂KI (Hình 3 và 4).

Một tuần sau nuôi cấy, vỏ hạt nhạt màu dần và trở nên trong suốt, có thể thấy rõ tiền phôi màu trắng ở cuối tuần thứ 3. Số lượng tiền phôi màu trắng tăng nhanh và đạt cực đại ở tuần thứ 4 trên các môi trường khảo sát, cao nhất trên môi trường MS $\frac{1}{4}$ (Bảng 1).

Bảng 1. Sự tạo tiền phôi màu trắng lan hài theo thời gian nuôi cấy hạt, trên các môi trường MS, MS ½, MS ¼ trong điều kiện tối của phòng tăng trưởng.

Nghiệm thức	% Tiền phôi màu trắng theo thời gian nuôi cấy		
	2 tuần	3 tuần	4 tuần
MS	0,8 ± 0,1 ^b	34,1 ± 1,6 ^c	50,9 ± 0,2 ^c
MS ½	1,4 ± 0,3 ^b	42,7 ± 2,1 ^b	66,0 ± 0,2 ^b
MS ¼	7,9 ± 0,1 ^a	60,9 ± 0,6 ^a	80,7 ± 0,1 ^a
CV %	11,3	5,8	0,5
F tính	313,4	79,9	6008

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức p=0,05.

Hình hưởng của ánh sáng lên sự phát triển phôi lan hài.

Hạt lan hài sau 4 tuần nuôi cấy ở điều kiện có và không có ánh sáng trên môi trường MS ¼ có bổ sung gibberellin ở các nồng độ đều có sự xuất hiện tiền phôi màu trắng, tỷ lệ cao nhất với xử lý GA₃ 0,001 mg/L, trong tối (Hình 5; 6 và Bảng 2).

Ảnh hưởng của xử lý lạnh kết hợp với xử lý gibberellin lên sự phát triển phôi lan hài.

GA₃ ở nồng độ 0,001 mg/L kích thích mạnh

sự tạo tiền phôi từ hạt so với đối chứng và GA₃ ở nồng độ cao 1 mg/L dù được xử lý lạnh hay không (Bảng 3).

Sau 4 tuần nuôi cấy, tiền phôi màu trắng xuất hiện (Hình 7) nhưng chưa phát triển chồi mầm và rễ mầm (Hình 8). Sau 8 tuần nuôi cấy, phôi lan hài có màu trắng (Hình 9), bên trong có sự xuất hiện phôi hình cầu và dây treo rất rõ dưới kính hiển vi quang học (Hình 10).

Bảng 2. Sự tạo tiền phôi màu trắng sau 4 tuần nuôi cấy hạt, điều kiện chiếu sáng khác nhau, trên các môi trường MS ¼ với gibberellin ở các nồng độ khác nhau.

Xử lý	% tiền phôi màu trắng trên các môi trường với GA ₃ (mg/L)		
	0	0,001	0,01
Sáng	52,3 ± 0,6 ^c	70,4 ± 0,2 ^a	61,0 ± 0,4 ^b
Tối	80,7 ± 0,1 ^c	99,5 ± 0,0 ^a	94,9 ± 0,0 ^b
T-test	*	*	*

Các số trung bình trong hàng với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức p = 0,05

“*”: Khác biệt có ý nghĩa thống kê với mức p = 0,05

“ns”: Khác biệt không có ý nghĩa thống kê với mức p = 0,05

Bảng 3. Sự tạo tiền phôi màu trắng sau 4 tuần nuôi cấy trên các môi trường MS ¼ có bổ sung GA₃ ở các nồng độ khác nhau theo thời gian xử lý lạnh.

Nồng độ GA ₃ (mg/L)	% Tiền phôi màu trắng tạo ra theo thời gian xử lý lạnh (tuần)			
	0	1	2	3
0	80,7 ± 0,1 ^{a4}	80,8 ± 0,1 ^{a4}	80,5 ± 0,1 ^{a4}	80,4 ± 0,2 ^{a4}
0,001	99,5 ± 0,0 ^{ab1}	99,5 ± 0,0 ^{ab1}	99,8 ± 0,0 ^{a1}	99,4 ± 0,1 ^{b1}
0,01	94,9 ± 0,1 ^{bc2}	95,2 ± 0,2 ^{ab2}	95,3 ± 0,0 ^{a2}	94,8 ± 0,0 ^{c2}
0,1	90,1 ± 0,0 ^{ab3}	90,0 ± 0,0 ^{ab3}	90,2 ± 0,0 ^{a3}	89,8 ± 0,2 ^{b3}
1,0	77,3 ± 0,1 ^{b5}	77,5 ± 0,2 ^{ab5}	78,1 ± 0,2 ^{a5}	77,6 ± 0,2 ^{ab5}
CV%	0,2	0,3	0,3	0,3
F	9881	4810	5148	2716

Các số trung bình trong hàng với các mẫu tự khác nhau và trong cột với các số khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức p = 0,05

Hoạt tính các chất điều hòa sinh trưởng thực vật

Trái bảo quản ở 5 ± 1 °C và nuôi trên môi trường MS ¼ với GA₃ 0,001 mg/L. Hoạt tính gibberellin tăng dần khi hạt hấp thu nước cho đến khi có sự xuất hiện protocorm màu trắng giai đoạn 16 tuần tuổi, đặc biệt tăng mạnh khi có sự hóa xanh protocorm ở tuần 28. Ngược lại, hoạt tính của acid abscisic cao khi hạt mới thu hoạch, và giảm mạnh trong quá trình nảy mầm của hạt. Hoạt tính của auxin và cytokinin rất thấp ở hạt

trưởng thành. Sau bảo quản lạnh 2 tuần ở 5 ± 1 °C và nuôi cấy trên môi trường MS ¼ với GA₃ 0,001 mg/L, hoạt tính của auxin và cytokinin giảm nhẹ khi hạt bắt đầu trương nước (tuần thứ 2), đặc biệt tăng mạnh cùng với gibberellin khi có sự hóa xanh protocorm.

Xét về tỷ lệ cytokinin/auxin, hạt sau khi nảy mầm và tạo được protocorm màu xanh cho kết quả cao nhất, đó cũng là lúc hoạt tính của abscisic acid xuống thấp nhất (Bảng 4).

Bảng 4. Sự thay đổi hoạt tính các chất điều hòa sinh trưởng thực vật tổng cộng trong quá trình nảy mầm của hạt lan hài trên môi trường MS ¼ với GA₃ 0,001 mg/L.

Thời gian (tuần)	Hoạt tính các hormone nội sinh trong hạt (µg/g)				Tỷ lệ C/A
	Auxin	Cytokinin	Gibberellin	Acid abscisic	
2	$0,92 \pm 0,14^c$	$1,55 \pm 0,28^b$	$6,18 \pm 0,45^b$	$1,98 \pm 0,10^c$	1.68
16	$1,44 \pm 0,07^b$	$2,97 \pm 0,41^b$	$7,59 \pm 0,52^b$	$1,51 \pm 0,10^b$	2.06
28	$2,80 \pm 0,16^a$	$9,85 \pm 0,82^a$	$9,04 \pm 0,56^a$	$0,93 \pm 0,13^a$	3.52

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p=0,05$

Hình hưởng của nồng độ BA, IAA, và GA₃ lên sự phát triển chồi.

Tỷ lệ tạo protocorm và chồi: Trên môi trường MS ¼ có bổ sung BA ở các nồng độ, riêng rẽ hay kết hợp với IAA và GA₃, môi trường với BA 2,0 mg/L riêng rẽ hay phối hợp với IAA 0,1 mg/L (không có GA₃) kích thích mạnh sự tạo protocorm màu trắng hay vàng (Bảng 5). Tuy nhiên, môi trường với BA 2,0 mg/L phối hợp với IAA 0,1 mg/L kích thích mạnh sự tạo protocorm màu xanh lục và chồi (Bảng 6).

Các biến đổi hình thái và cấu trúc: Sau 4 tuần nuôi cấy phôi 12 tuần tuổi trên môi trường MS ¼ với BA 2,0 mg/L và IAA 0,1 mg/L, có sự xuất hiện một khối mô màu trắng đục, có hình cầu hay hình trứng, thoát ra khỏi vỏ hạt (protocorm màu

trắng) (Hình 11). Bên trong các protocorm màu trắng này, có sự hình thành các tế bào đẳng kính, nhân to, nhưng chưa có cực rễ, cực chồi (Hình 12).

Sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS ¼ với BA 2,0 mg/L và IAA 0,1 mg/L, protocorm có dạng hình thoi với hai đầu thuôn nhọn, màu vàng nhạt (Hình 13) và hoá màu xanh lục ở tuần 16 (Hình 14), bên trong có sự xuất hiện mô phân sinh ngọn chồi (Hình 15).

Sau 24 tuần nuôi cấy trên môi trường MS ¼ với BA 2,0 mg/L và IAA 0,1 mg/L, có sự xuất hiện chồi rất rõ, phía tiếp xúc môi trường có sự hiện diện của rễ tơ (Hình 16), bên trong với sự xuất hiện của hệ thống mô mạch rất phát triển (Hình 17).

Bảng 5. Sự phát triển protocorm từ phôi 12 tuần tuổi trên các môi trường MS ¼ có bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau, riêng rẽ hay phối hợp với IAA 0,1 mg/L hoặc IAA 0,1 mg/L phối hợp với GA₃ ở các nồng độ khác nhau theo thời gian nuôi cấy.

Nồng độ (mg/L)			% Protocorm trắng đục (4 tuần)	% Protocorm vàng nhạt (8 tuần)
IAA	GA ₃	BA		
0	0	0	54,0 ± 0,5 ^h	36,3 ± 0,4 ⁱ
0,1	0,01	0	72,8 ± 0,3 ^{cd}	51,3 ± 0,7 ^e
	0,001	0	80,8 ± 0,7 ^b	60,0 ± 0,3 ^b
0,1	0	0,5	66,3 ± 0,4 ^f	42,0 ± 0,3 ^g
	0	1,0	69,8 ± 0,6 ^e	47,1 ± 0,6 ^f
	0	2,0	87,2 ± 0,2 ^a	64,0 ± 0,3 ^a
	0	4,0	73,8 ± 0,6 ^c	51,0 ± 0,5 ^e
0	0	0,5	61,3 ± 0,3 ^g	40,3 ± 0,3 ^h
	0	1,0	67,8 ± 0,6 ^f	43,0 ± 0,6 ^g
	0	2,0	82,3 ± 0,4 ^b	58,5 ± 0,0 ^c
	0	4,0	72,2 ± 0,7 ^d	52,7 ± 0,2 ^d
CV%			1,2	1,5
F			330,5	416,4

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức p=0,05

Bảng 6. Sự hóa xanh protocorm và sự tạo chồi từ phôi 12 tuần tuổi trên các môi trường MS ¼ có bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau, riêng rẽ hay phối hợp với IAA 0,1 mg/L hoặc IAA 0,1 mg/L phối hợp với GA₃ ở các nồng độ khác nhau theo thời gian nuôi cấy.

Nồng độ (mg/L)			% Protocorm màu xanh lục (16 tuần)	% Chồi xuất hiện (24 tuần)
IAA	GA ₃	BA		
0	0	0	33,0 ± 1,0 ^g	29,2 ± 0,7 ^g
0,1	0,01	0	47,5 ± 0,5 ^{cd}	42,8 ± 0,3 ^{cd}
	0,001	0	54,8 ± 0,6 ^b	47,7 ± 1,3 ^b
0,1	0	0,5	38,5 ± 0,5 ^f	34,5 ± 0,3 ^f
	0	1,0	42,8 ± 0,4 ^e	38,5 ± 0,9 ^e
	0	2,0	61,3 ± 0,4 ^a	55,7 ± 0,9 ^a
	0	4,0	45,3 ± 1,5 ^d	41,0 ± 2,2 ^{de}
0	0	0,5	38,2 ± 0,4 ^f	33,5 ± 0,3 ^f
	0	1,0	39,2 ± 0,9 ^f	34,7 ± 0,7 ^f
	0	2,0	53,3 ± 0,9 ^b	46,0 ± 2,0 ^{bc}
	0	4,0	48,2 ± 0,8 ^c	42,0 ± 2,0 ^{de}
CV%			3,0	5,3
F			111,6	36,2

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức p=0,05

Hình hưởng của BA và sự gây vết thương lên sự phát triển chồi từ protocorm màu trắng.

Rạch những vết thương nhỏ, nhẹ lên protocorm màu trắng đục (Hình 18) và nuôi trên môi trường MS ¼ với BA ở các nồng độ. Sau 18 tuần nuôi cấy protocorm bị gây vết thương, chồi xuất hiện trên bề mặt các vết cắt (Hình 19), tỷ lệ protocorm tạo chồi và số chồi trung bình tạo ra từ

mỗi protocorm trên môi trường MS ¼ với BA ở các nồng độ so với đối chứng (Bảng 7). Sau 24 tuần nuôi cấy, trên bề mặt các vết thương có sự hiện diện của cụm chồi (Hình 20). Tách chồi mới từ các cụm chồi và nuôi trên các môi trường mới cùng thành phần thu được cây lan con khỏe mạnh với đầy đủ chồi và rễ ở tuần 38 (Hình 21).

Bảng 7. Sự phát triển chồi lan hài sau 18 tuần nuôi cấy protocorm màu trắng (có nguồn gốc từ phôi 12 tuần tuổi) đã bị gây vết thương và nuôi trên các môi trường MS ¼ bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau. Đối chứng là môi trường MS ¼ với BA 2,0 mg/L dùng để nuôi protocorm không gây vết thương.

Nồng độ BA (mg/L)	% Protocorm tạo chồi	Số chồi trung bình/protocorm
Đối chứng	45,8 ± 2,1 ^a	1,2 ± 0,0 ^d
0	19,3 ± 0,3 ^d	5,1 ± 0,3 ^c
0,5	27,0 ± 0,6 ^c	5,2 ± 0,1 ^c
1,0	35,3 ± 0,3 ^b	6,8 ± 0,4 ^{bc}
2,0	46,3 ± 0,3 ^a	14,4 ± 1,2 ^a
4,0	34,7 ± 0,9 ^b	8,3 ± 0,6 ^b
CV%	4,9	14,5
F	111,5	58,9

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p = 0,05$.

Sự tạo rễ và phát triển cây hoàn chỉnh từ chồi

Tỷ lệ chồi tạo rễ tăng theo cường độ IAA cho tới 2,0 mg/L, dù có hay không có sự bổ sung BA vào môi trường nuôi (Bảng 8). IAA 2,0 mg/L riêng rẽ hay kết hợp với BA 0,1 mg/L cũng kích thích sự tạo chồi và tăng trưởng lá (Bảng 9) và tăng trưởng rễ (Bảng 10).

Chồi sau 40 tuần nuôi trong môi trường MS ¼ với BA 2,0 mg/L và IAA 0,1 mg/L, trên bề mặt có sự xuất hiện tế bào lông rễ (Hình 22) được cấu tạo bởi 1 tế bào biểu bì trong suốt, dài khoảng 500 μm (Hình 23). Sau cấy chuyển lên môi trường MS ¼ với IAA ở các nồng độ riêng rẽ

hay kết hợp với BA 0,1 mg/L, rễ thật xuất hiện sau ít nhất 4 tuần nuôi cấy (Hình 24). Hình giải phẫu cho thấy rễ có nguồn gốc nội sinh kéo dài (Hình 25). Cây con với chồi, rễ chính sau 12 tuần nuôi cấy trên môi trường MS ¼ có bổ sung BA 0,1 mg/L và IAA 2,0 mg/L có sự xuất hiện cụm chồi (Hình 26). Sau 14 tuần nuôi cấy, cụm chồi được tách ra (Hình 27) và nuôi cấy trên môi trường mới cùng thành phần. Cây con khỏe mạnh từ cụm chồi 14 tuần tuổi có lá xanh với đầy đủ chồi, rễ thật được quan sát sau 8 tuần nuôi cấy (Hình 28) và được chuyển ra vườn ươm 20 tuần sau đó (Hình 29).

Bảng 8. Sự phát triển rễ lan hài từ chồi 40 tuần tuổi trên các môi trường MS ¼ có bổ sung IAA ở các nồng độ khác nhau, riêng rẽ hay kết hợp với BA 0,1 mg/L theo thời gian nuôi cấy.

Nồng độ (mg/L)		% Chồi tạo rễ theo thời gian nuôi cấy (tuần)		
BA	IAA	4	8	12
0	0	28,2 ± 0,4 ^{de}	50,0 ± 0,0 ^f	64,8 ± 1,8 ^f
0,0	0,5	26,7 ± 0,8 ^e	53,3 ± 0,8 ^{de}	71,7 ± 0,8 ^e
	1,0	27,5 ± 1,4 ^{de}	55,8 ± 0,8 ^{cd}	72,5 ± 0,0 ^e
	2,0	30,8 ± 0,8 ^{bc}	60,8 ± 0,8 ^b	90,0 ± 0,0 ^b
	4,0	32,5 ± 0,0 ^b	57,5 ± 0,0 ^c	85,0 ± 0,0 ^c
0,1	0,5	27,5 ± 0,0 ^{de}	53,3 ± 1,7 ^{de}	72,5 ± 1,4 ^e
	1,0	29,2 ± 0,8 ^{cd}	50,8 ± 0,8 ^{ef}	76,7 ± 0,8 ^d
	2,0	40,0 ± 0,0 ^a	67,5 ± 0,0 ^a	99,1 ± 0,8 ^a
	4,0	32,5 ± 0,0 ^b	55,8 ± 0,8 ^{cd}	92,5 ± 1,4 ^b
CV%		3,9	2,5	2,2
F		36,1	42,5	124,3

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p=0,05$

Bảng 9. Sự phát triển chồi và lá lan hài sau 12 tuần nuôi cấy chồi 40 tuần tuổi trên các môi MS ¼ bổ sung IAA ở các nồng độ khác nhau, riêng rẽ hay phối hợp với BA 0,1 mg/L.

Môi trường (mg/L)		Số chồi	Chiều dài lá (mm)	Chiều rộng lá (mm)	Diện tích lá (mm ²)
BA	IAA				
0	0,0	1,0 ± 0,0 ^e	7,4 ± 0,7 ^{de}	3,2 ± 0,3 ^c	10,6 ± 0,9 ^f
0	0,5	1,5 ± 0,3 ^{cde}	6,3 ± 0,6 ^e	2,7 ± 0,3 ^c	13,4 ± 1,3 ^{ef}
	1,0	2,0 ± 0,4 ^{bcde}	7,4 ± 0,1 ^{de}	3,2 ± 0,1 ^c	16,6 ± 0,2 ^{de}
	2,0	3,0 ± 0,4 ^{ab}	13,3 ± 0,4 ^a	5,7 ± 0,3 ^a	33,9 ± 1,5 ^a
	4,0	1,8 ± 0,5 ^{cde}	11,6 ± 0,7 ^{bc}	5,2 ± 0,5 ^a	29,1 ± 2,1 ^b
0,1	0,5	1,3 ± 0,3 ^{de}	8,2 ± 0,5 ^d	3,4 ± 0,2 ^c	18,8 ± 1,3 ^d
	1,0	2,3 ± 0,3 ^{bcd}	13,0 ± 0,4 ^{ab}	5,0 ± 0,1 ^a	32,1 ± 0,2 ^{ab}
	2,0	3,8 ± 0,3 ^a	13,7 ± 0,4 ^a	5,1 ± 0,1 ^a	34,0 ± 0,6 ^a
	4,0	2,5 ± 0,3 ^{bc}	10,5 ± 0,3 ^c	4,1 ± 0,1 ^b	25,1 ± 0,7 ^c
CV%		9,5	10,1	12,3	9,7
F		7,5	31,2	18,2	62,5

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức p=0,05

Bảng 10. Sự phát triển rễ bất định lan hài sau 8 tuần nuôi cấy chồi 14 tuần tuổi trên các môi trường MS ¼ có bổ sung IAA ở các nồng độ khác nhau, riêng rẽ hay phối hợp với BA 0,1 mg/L.

Môi trường (mg/L)		Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (mm)	Đường kính rễ (mm)
BA	IAA			
0	0,0	1,5 ± 0,3 ^c	1,9 ± 0,1 ^e	0,93 ± 0,03 ^d
0	0,5	1,8 ± 0,2 ^{bc}	3,6 ± 0,5 ^d	0,95 ± 0,03 ^{cd}
	1,0	1,5 ± 0,5 ^c	4,2 ± 0,2 ^{cd}	0,98 ± 0,02 ^{bcd}
	2,0	2,5 ± 0,5 ^{abc}	5,5 ± 0,6 ^c	1,05 ± 0,03 ^{ab}
	4,0	2,8 ± 0,2 ^{abc}	7,0 ± 0,4 ^b	1,05 ± 0,03 ^{ab}
0,1	0,5	2,2 ± 0,5 ^{abc}	3,7 ± 0,5 ^d	0,93 ± 0,02 ^d
	1,0	3,5 ± 0,3 ^a	3,2 ± 0,2 ^{de}	1,03 ± 0,02 ^{abc}
	2,0	3,2 ± 0,5 ^a	9,4 ± 0,9 ^a	1,08 ± 0,02 ^a
	4,0	3,0 ± 0,4 ^{ab}	7,6 ± 0,4 ^b	1,03 ± 0,02 ^{abc}
CV%		32,5	19,2	17,3
F		3,551	23,9	4,7

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức p = 0,05

THẢO LUẬN

Thay đổi hình thái trong sự phát triển phôi lan hài

Hạt lan khi nuôi cấy ở trạng thái chưa phân hóa và không có chất dự trữ là tinh bột. Điều này cũng phù hợp với giả thuyết: hạt lan có phôi mầm mà không có phôi nhũ, nơi chứa chất dự trữ cần thiết cho sự nảy mầm của hạt. Sự thiếu vắng nội nhũ là một trong những tác nhân khiến hạt lan rất khó nảy mầm nếu như không có nấm mycorrhizal ký sinh hoặc không được nuôi trong môi trường thích hợp [6].

Ở *C. sinense* cũng như ở *P. delenatii*, một lớp tiền bì xuất hiện rất sớm, ngay từ giai đoạn phát triển phôi cầu [7]. Sự phát triển nhanh chóng của lớp biểu bì là kết quả của sự thích nghi với môi trường độc đáo xung quanh trong quá trình phát triển phôi lan. Ở lan, nội nhũ không phát triển trong giai đoạn phát triển của hạt. Hơn nữa, vỏ hạt mỏng không thể bảo vệ cho phôi, đặc biệt là sự duy trì độ ẩm. Sự hình thành lớp biểu bì đặc trưng trên bề mặt của phôi cùng các lớp bên trong của vỏ hạt có thể duy trì độ ẩm cho các tế bào phôi. Lớp biểu bì này cũng có thể bảo vệ phôi trong suốt quá trình nảy mầm khỏi các tác nhân

vật lý. Tuy nhiên, sự phát triển mạnh của lớp biểu bì lại là một trong những trở ngại khiến hạt khó nảy mầm trong ống nghiệm [8].

Phôi lan hài *P. dianthum* ở giai đoạn 8 tuần tuổi có phôi hình cầu với dây treo rất đặc trưng (Hình 10). Dây treo là một cơ quan phôi của thực vật có hoa với đời sống ngắn, để gắn phôi vào vỏ hạt [9]. Dây treo có chức năng dẫn truyền và cung cấp các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển của phôi [8, 9, 10]. Tùy theo loài, dây treo của lan có thể là đơn bào hoặc một chuỗi các tế bào dính lại với nhau [11, 12]. Giai đoạn phôi bốn tế bào, tế bào dây treo đầu tiên xuất hiện có một không bào nổi bật nằm phía cuối của tế bào lỗ noãn [13]. Sau giai đoạn phôi hình cầu, sự tăng trưởng của protocorm và khả năng tạo cây con khá dễ dàng trên các môi trường nuôi cấy.

Sau 4 tuần nuôi cấy từ phôi 12 tuần tuổi, trên các môi trường đều có sự xuất hiện khối mô màu trắng, lú ra khỏi vỏ gọi là protocorm. Protocorm là thuật ngữ được sử dụng để chỉ các cấu trúc chuyển tiếp giữa sự nảy mầm và cây con, có hình cầu hay hình trứng, với một số lông hấp thu đơn bào ở phần gốc và một mô phân sinh ngọn ở đỉnh [14]. Protocorm của phần lớn lan biểu sinh nhiệt đới có khả năng phát triển thành chồi trực tiếp, và lớp tiền bì (protoderm) xuất hiện sớm trong sự biệt hoá phôi [13, 14, 15].

Ảnh hưởng của phytohormone trong sự phát triển phôi lan hài

Vai trò của auxin

Sự hiện diện của các tế bào vùng trung tâm mô phân sinh ngọn chồi có liên quan trong sự tổng hợp IAA trong phôi hợp tử *Arabidopsis* [16, 17]. Ở *P. dianthum* sau 8 tuần nuôi trong tối, trên môi trường MS ¼ bổ sung GA₃ 0,001 mg/L thấy có sự xuất hiện phôi màu trắng. Mẫu sau khi chuyển sang môi trường MS ¼ có bổ sung BA ở các nồng độ riêng rẽ hay phối hợp IAA 0,1 mg/L đều thấy có sự xuất hiện protocorm màu trắng sau 4 tuần nuôi cấy từ phôi 12 tuần tuổi, với tỷ lệ rất khác nhau (Bảng 5). Nồng độ BA 2,0 mg/L dù

có sự hiện diện của IAA 0,1 mg/L hay không vẫn cho hiệu quả tạo protocorm màu trắng cao, chứng tỏ BA 2,0 mg/L rất cần thiết cho giai đoạn tạo protocorm màu trắng. Sự phối hợp của BA 2,0 mg/L và IAA 0,1 mg/L làm tăng khả năng tạo phôi màu trắng lên đến 41,5 % so với đối chứng MS ¼ (Bảng 5), và các phôi màu trắng cho hiệu quả tạo phôi hình kim tự tháp (giai đoạn protocorm 16 tuần sau nuôi cấy từ phôi 12 tuần tuổi) khoảng 61,3 % (Bảng 6). Có lẽ, IAA trong vùng trung tâm mô phân sinh, hoặc ngoại sinh từ môi trường đi vào đủ để đáp ứng nhu cầu phân bố auxin trong phôi.

Vai trò của cytokinin

Sau 4 tuần nuôi cấy từ phôi 12 tuần tuổi, hàm lượng zeatin tăng cao, tương ứng với sự hiện diện với lượng lớn ti thể, chuẩn bị cho phân chia tế bào dẫn tới sự hình thành protocorm màu trắng (Bảng 4). Cytokinin có tác động lên tế bào thông qua sự hoạt hóa các protein kinase trong con đường truyền tín hiệu [18], qua đó thúc đẩy sự phiên mã, kích thích sự tổng hợp protein và các enzyme đặc hiệu liên quan trong phân chia tế bào [19, 20].

Sự tăng mạnh zeatin sau 16 tuần nuôi cấy từ phôi 12 tuần tuổi (giai đoạn protocorm màu xanh lục) cần thiết cho sự duy trì hoạt động của mô phân sinh ngọn chồi. Các nghiên cứu trên lúa và *Arabidopsis* cho thấy sự mất chức năng của gen kiểm soát sự chuyển cytokinin nucleotide (dạng liên kết, bất hoạt) thành dạng tự do (có hoạt tính sinh học) dẫn đến sự kết thúc sớm hoạt động của mô phân sinh ngọn chồi: mô phân sinh ngọn chồi không thể tiếp tục phát triển bình thường [21, 22].

Sau 16 tuần nuôi cấy từ phôi 12 tuần tuổi trên môi trường MS ¼ bổ sung GA₃ 0,001 mg/L thấy hàm lượng auxin và zeatin tăng rất mạnh (Bảng 4). Lúc này phôi xuất hiện ở dạng hình nui lửa hay hình kim tự tháp và tiếp tục tăng trưởng rất nhanh. Sự gia tăng mạnh hàm lượng auxin và zeatin trong phôi kích thích sự hoạt động của các tế bào trung tâm mô phân sinh ngọn của phôi, và

sự tổng hợp auxin trong phôi (có thể từ phôi hay từ môi trường di chuyển vào) đủ mạnh để có đủ auxin cho sự di chuyển hữu cực đặc biệt (hướng gốc và đến các vị trí sẽ hình thành cơ quan phôi) để hình thành các cơ quan phôi. Vì vậy, sự phát triển của mô phân sinh ngọn chồi và ngọn rễ của phôi được thực hiện và phôi có thể trưởng thành để tạo cây hoàn chỉnh. Bên cạnh đó, sự kết hợp auxin và cytokinin ở một tỷ lệ nhất định cần thiết cho sự phát triển phôi bình thường. Trong quá trình phát triển phôi, nếu auxin có vai trò xác định vị trí thành lập cũng như sự phát triển sau đó của cơ quan phôi thì cytokinin có vai trò đặc biệt quan trọng trong sự duy trì hoạt động của mô phân sinh ngọn chồi [18, 23].

Vai trò của gibberellin

Gibberellin thường ít khi được sử dụng phối hợp với các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác trong quá trình phát sinh phôi soma. Tuy nhiên các nhà khoa học cũng chứng minh rằng gibberellin cũng có vai trò trong một số trường hợp giúp cho sự tăng trưởng của phôi hoặc kích thích sự ra rễ và những tăng trưởng sau của cây, hoặc gibberellin giúp cho phôi thoát ra khỏi trạng thái miên trạng [24].

Ở *P. dianthum*, môi trường MS ¼ với GA₃ dù nồng độ rất thấp, chỉ 0,001 mg/L cũng cho hiệu quả không có sự khác biệt với môi trường MS ¼ với BA 2,0 mg/L trong sự tạo protocorm màu trắng từ phôi hình cầu (Bảng 5). Ngoài ra, môi trường MS ¼ với GA₃ 0,001 mg/L cho khả năng tạo protocorm màu xanh lục không có sự khác biệt so với môi trường MS ¼ với BA 2,0 mg/L (Bảng 6). Điều này cho thấy GA₃ rất quan trọng trong quá trình phát triển phôi của hạt lan hài *P. dianthum*. Ở nồng độ cao, GA₃ làm giảm khả năng tạo tiền phôi màu trắng (Bảng 3), giảm khả năng tạo protocorm màu xanh lục (Bảng 6). Hiểu biết về sự nảy mầm ở *Paphiopedilum* nói chung còn nhiều hạn chế [25] và cơ chế làm giảm khả năng tạo phôi, tạo protocorm từ hạt khi bổ

sung GA₃ nồng độ cao vào môi trường nuôi cấy đến nay còn chưa rõ [4].

Vai trò của phytohormone trong sự phát triển chồi

Ở lan, sự phát sinh chồi thường bắt nguồn từ các protocorm màu xanh hoặc từ protocorm màu trắng bị gây vết thương. Trong tự nhiên, chồi ngọn đang phát triển cung cấp auxin cho cây. Sự hiện diện của auxin làm gia tăng cường độ hô hấp theo 2 cách: trực tiếp huy động chất dự trữ tạo nguồn nguyên liệu cho hô hấp tế bào hay gián tiếp thông qua sự hoạt động của ethylene [18, 26]. Khi gây vết thương lên protocorm màu trắng, chính vết thương đã tạo ra phần lớn auxin cung cấp cho mẫu cấy, do vậy chỉ cần nuôi các protocorm này trên môi trường MS ¼ với BA ở các nồng độ khác nhau. Sự kết hợp của auxin nội sinh và BA ngoại sinh từ môi trường làm gia tăng đáng kể tỷ lệ tạo chồi từ mẫu cấy (Bảng 7). Sau 18 tuần nuôi cấy protocorm màu trắng bị gây vết thương, trên môi trường bổ sung BA 2,0 mg/L cho tỷ lệ tạo chồi và số chồi trên mỗi protocorm là cao nhất. Trên môi trường đối chứng cho tỷ lệ tạo chồi không có sự khác biệt so với nghiệm thức gây vết thương. Vì thế, môi trường bổ sung BA 2,0 mg/L cần thiết cho sự tăng trưởng và phát triển của protocorm. Mặt khác, khi nuôi trên cùng môi trường MS ¼ với BA 2,0 mg/L, protocorm không gây vết thương cho hiệu quả tạo chồi rất thấp so với protocorm gây vết thương cho 14,4 chồi/protocorm. Điều này cho thấy, môi trường có bổ sung BA 2,0 mg/L chỉ có tác dụng tăng trưởng chồi. Sự kết hợp của BA 2,0 mg/L và auxin nội sinh tạo ra từ vết thương có tác động rất mạnh lên sự tăng trưởng chồi cũ và tạo chồi mới (Bảng 7). Trên các môi trường MS ¼ có bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau đều cho sự tạo chồi mới và tăng theo hàm lượng BA bổ sung. Ở nồng độ BA cao có thể ức chế khả năng tạo chồi và giảm tỷ lệ sống của mẫu (Bảng 7). Ngoài ra, protocorm bị gây vết thương và nuôi trên môi trường đối chứng MS ¼ cũng có sự xuất hiện

chồi mới, chúng tỏ auxin nội sinh tạo ra từ các vết thương có tác động rất mạnh đến sự tạo chồi mới. Điều này có nghĩa là: khi cần tạo chồi mới có thể cho mẫu cây vào môi trường có bổ sung auxin và cytokinin ở các nồng độ khác nhau hoặc bằng cách gây vết thương lên mẫu. Tuy nhiên, tùy từng loại cây, tùy từng loại mẫu cây mà có thể dùng dạng auxin và cytokinin cũng như nồng độ mỗi loại. Kết quả này cũng phù hợp với thí nghiệm gây vết thương phần chồi không chứa rễ trên cây *P. delatanii* và nuôi trên các môi trường dinh dưỡng nhằm tạo chồi mới của Nhut và cộng sự [27]. Sau thí nghiệm, nhóm tác giả kết luận: (1) không có sự xuất hiện chồi mới ở những mẫu chồi không gây vết thương và nuôi trên các môi trường dinh dưỡng; (2) tỷ lệ mẫu sống cao nhất ở mẫu bị gây vết thương và nuôi cây trên môi trường chứa 0,5 mg/L TDZ, mà không có sự bổ sung auxin ngoại sinh; (3) vết thương là điều kiện tiên quyết cho sự hình thành chồi mới ở cây con; (4) số lượng chồi mới tạo ra tăng theo nồng độ TDZ (TDZ là một loại cytokinin tổng hợp); (5) TDZ ở nồng độ cao có thể ức chế sự tạo chồi và làm giảm tỷ lệ sống của mẫu.

Theo Davies (1995), sự hiện diện của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật nội sinh quyết định sự phát sinh hình thái. Sự hiện diện và hoạt động phối hợp của cytokinin và auxin giúp cho sự gia tăng kích thước tế bào, tác động lên cả 2 bước của quá trình phân chia (phân bào và phân nhân), và thúc đẩy quá trình phát sinh chồi [23, 28, 29]. Do vậy, sau 24 tuần nuôi cấy phôi 12 tuần tuổi, trên môi trường MS ¼ bổ sung BA 2,0 mg/L phối hợp với IAA 0,1 mg/L tỷ lệ chồi tạo ra được cải tiến mạnh. Cùng với sự gia tăng tỷ lệ tạo chồi là sự gia tăng hàm lượng zeatin trong chồi. Trong nuôi cấy *in vitro*, sự phát sinh chồi hay rễ chịu ảnh hưởng bởi tỷ lệ auxin/cytokinin [23, 30]. Sự gia tăng hàm lượng zeatin trong chồi lan hài sau 24 tuần nuôi cấy trên môi trường có sự phối hợp auxin và cytokinin đã làm cho tỷ lệ

auxin/cytokinin thiên về cytokinin (tỷ lệ auxin/cytokinin thấp), dẫn đến tỷ lệ chồi gia tăng.

Vai trò phytohormone trong sự phát triển rễ bất định từ khúc cắt mang chồi: Sự hình thành rễ xảy ra khi các khúc cắt mang chồi chuyển từ môi trường MS ¼ với BA 2,0 mg/L và IAA 0,1 mg/L sang môi trường MS ¼ với IAA ở các nồng độ, riêng rẽ hoặc phối hợp với BA 0,1 mg/L. Sự phát sinh hình thái rễ ở lan hài cũng giống như ở các loài đơn tử diệp nói chung trải qua 4 giai đoạn [31]: tạo tế bào hoạt hóa, hình thành vùng tế bào mô phân sinh, hình thành sơ khởi rễ và kéo dài rễ. Ở song tử diệp, sự hình thành rễ gồm 2 giai đoạn: giai đoạn hoạt động của vài tế bào thuộc tầng phát sinh libe-mộc hoặc chu luân để tạo ra một nhóm tế bào sơ khởi của rễ (giai đoạn tạo sơ khởi rễ) và giai đoạn kéo dài sơ khởi rễ [32]. Theo cách phân chia này, ba giai đoạn đầu của sự hình thành rễ ở lan hài tương ứng với giai đoạn tạo sơ khởi rễ.

Ở *P. dianthus* tỷ lệ chồi tạo được rễ sau 12 tuần cấy chuyên cao nhất trên môi trường MS ¼ với IAA 2,0 mg/L phối hợp với BA 0,1 mg/L và không có sự khác biệt về tỷ lệ mẫu chồi tạo được rễ trên các môi trường MS ¼ hoặc MS ¼ với IAA ở nồng độ 0,5 và 1,0 mg/L hoặc MS ¼ với IAA 0,5 mg/L và BA 0,1 mg/L (Bảng 8). Thông thường, mẫu cho số lượng rễ/chồi càng nhiều thì chiều dài rễ sẽ giảm. Tuy nhiên, ở nồng độ IAA thích hợp sẽ cho số lượng rễ/chồi và chiều dài rễ tăng. Trong nghiên cứu này, môi trường MS ¼ bổ sung IAA 2,0 mg/L phối hợp với BA 0,1 mg/L cho số rễ và chiều dài rễ cao nhất (Bảng 10). Sự phối hợp đồng thời này giúp rễ phát triển sớm hơn và nhiều hơn so với các xử lý còn lại.

Sự hiện diện của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật nội sinh, đặc biệt là auxin và cytokinin, đóng vai trò cảm ứng sự hoạt hóa tế bào để hình thành mô phân sinh ngọn rễ [18, 33]. Điều này thể hiện rõ qua sự hiện diện của IAA và zeatin ở hàm lượng cao khi có sự xuất hiện chồi sau 44 tuần nuôi cấy từ phôi 12 tuần tuổi, giúp

cho mẫu cấy dễ dàng đáp ứng với chất điều hòa sinh trưởng thực vật ngoại sinh, dẫn tới sự tạo rễ ở các mẫu cấy.

KẾT LUẬN

Sự nảy mầm của hạt lan hài cần điều kiện tối hoàn toàn ở 22 ± 1 °C.

GA₃ ở nồng độ 0,001 mg/L kích thích mạnh sự tạo tiền phôi từ hạt.

Sự tạo chồi và cây con lan hài có thể diễn ra theo 2 cách:

Hạt – tiền phôi màu trắng – protocorm màu trắng – protocorm màu vàng – protocorm màu xanh – chồi – cây con.

Hạt – tiền phôi màu trắng (gây vết thương) – chồi – cây con.

Trong đó, phương pháp gây tổn thương cho hiệu quả tạo chồi cao hơn và môi trường MS ¼ bổ sung BA 2,0 mg/L cho hiệu quả cao nhất.

Môi trường MS ¼ có bổ sung IAA 2,0 mg/L phối hợp với BA 0,1 mg/L cho hiệu quả tạo rễ tốt nhất từ chồi lan hài *in vitro*.

Effect of plant growth regulators on the seed germination of the lady's slipper orchid *Paphiopedilum dianthum*

- **Pham Van Giao**
- **Bui Trang Viet**
University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

The environment has a strong influence to the germination of seeds. In this study, seeds of lady's slipper orchid at 200 days old were cold treatment (at 5 ± 1 °C) and cultivated on ¼ MS medium combined with different concentrations of GA₃ in the darkness. In these conditions, seeds began swollen on the second day, and after one week, seeds were transparent coat. The embryos appeared maximum at the fourth week but not yet rupturing the seed coat.

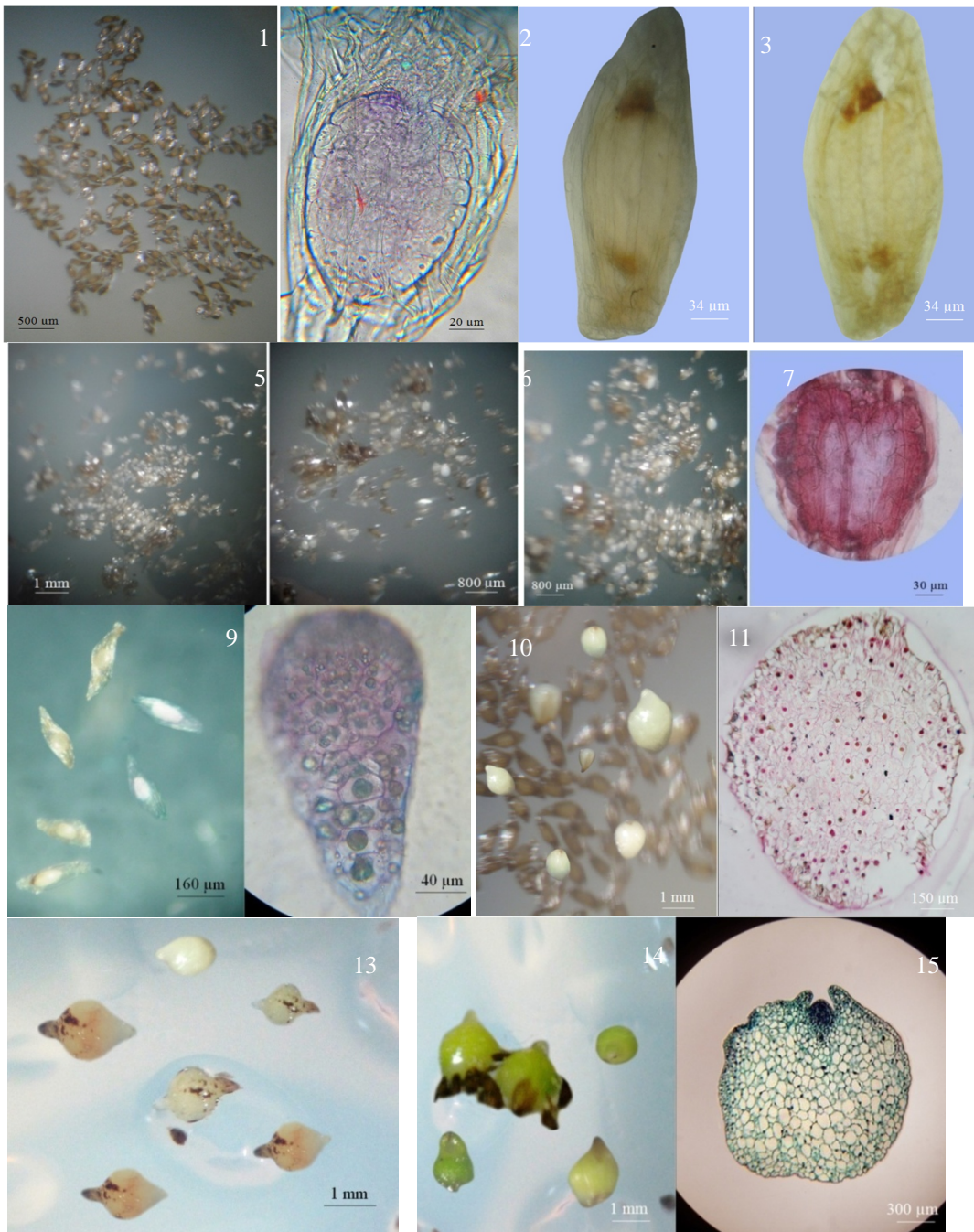
Key words: *plant growth regulators, seed germination, Paphiopedilum dianthum, Protocorm, shooting and rooting, embryo formation.*

The combination of cold treatment and 0.001 mg/L GA₃ stimulated the growth of embryo from the seed. Buds were found on ¼ MS medium supplemented with 0.1 mg/L IAA and 2.0 mg/L BA. The combination of 2.0 mg/L IAA with 0.1 mg/L BA strongly induced rooting from the shoots. Especially, making wounds on the surface allowed white protocorms to form seedlings and roots on the ¼ MS medium combined with 2.0 mg/L BA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. P. Cribb, The genus *Paphiopedilum*, second edition, *The Royal Botanic Gardens*, Kew. Natural History Publications (1998).
- [2]. L.V. Averyanov, P.Cribb, P.K. Loc, N.T. Hiep, Slipper orchids of Vietnam, Compass Press Limited, *The Royal Botanic Gardens*, Kew, UK (2003).
- [3]. J. Arditti, Micropropagation of Orchids, 2nd Edition. *Blackwell Publishing Ltd*, Maiden, MA, USA (2008).
- [4]. R.L.M. Pierik, P.A. Sprengels, B. Van Der Harst, Seed germination and further development of plantlets of *P. ciliolare* Pfitz. *In Vitro, Scientia Horticulturae*, 34, 139-153 (1988).
- [5]. B.T. Việt, Tìm hiểu và áp dụng các chất điều hòa sinh trưởng thực vật để khảo sát hiện tượng rụng “bông” và “trái non” tiêu, *Piper nigrum* L., Luận án phó tiến sĩ khoa học, chuyên ngành Sinh lý Thực vật, Đại học Tổng hợp Thành phố Hồ Chí Minh, 150 trang (1992).
- [6]. D.P. Stimart, P.D. Ascher, *In vitro* germination of *Paphiopedilum* seed on a completely defined medium, *Scientia Horticulturae*, 14, 165-170 (1981).
- [7]. E.C. Yeung., S.Y. Zee, X.L. Ye, Embryology of *Cymbidium sinense*: embryo development, *Annals of Botany*, 78, 105-110 (1996).
- [8]. E.C. Yeung, X.Y. Zee, X.L. Ye, Embryology of flowering plants, New Hampshire. *Science Publishers*, 2, 208-212 (2006).
- [9]. E.C. Yeung, D.W. Meinke, Embryogenesis in angiosperms: development of the suspensor, *Plant Cell*, 5, 1371-1381 (1993).
- [10]. Z.I. Nikitcheva, Embryology of flowering plants, New Hampshire, *Science Publishers*, 2, 198-202 (2006).
- [11]. M.A. Clements, Embryology. Genera orchidacearum, *Oxford University Press*, 1, 38-66 (1999).
- [12]. B.G.L. Swamy, Embryological studies in the Orchidaceae, *The American Midland Naturalist*, 41, 202-232 (1949).
- [13]. Y.I. Lee, E.C. Yeung, N. Lee, M.C. Chung, Embryo development in the lady's slipper orchid, *Paphiopedilum delenatii*, with emphasis on the ultrastructure of the suspensor, *Annals of Botany*, 98, 1311-1319 (2006).
- [14]. Y.I. Lee, E.C. Yeung, Embryology of the lady's slipper orchid, *P. delenatii*: Ovule development, *Botanical Studies*, 53, 97-104 (2012).
- [15]. C. Chang, Y.C. Chen, H.F. Yen, Protocorm or Rhizome? The morphology of seed germination in *Cymbidium dayanum* Reichb, *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 46, 71-74 (2005).
- [16]. P.D. Jeik, K.M. Barton, Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis, *Development*, 132, 16, 3577-3585 (2005).
- [17]. A. Vieten, M. Sauer, P.B. Brewer, J. Ftiml, Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development, *Trends in Plant Science*, 12, 4, 160-168 (2007).
- [18]. L. Taiz, E. Zeiger, Plant physiology, *The Benjamin/Cummings Publishing company, Inc* (2006).
- [19]. B.T. Việt, Sinh lý thực vật đại cương, Phần II: Phát triển, Nxb Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh (2000).
- [20]. D.L. Rayle, C.W. Ross, Estimation of osmotic parameters accompanying zeatin induced growth of detached cucumber cotyledons, *Plant Physiol*, 70, 1634-1646 (1982).
- [21]. T. Kurakawa, N. Ueda, M. Maekawa, K. Kobayashi, M. Kojima, Y. Nagato, H.

- Sakakibara, J. Kyojuka, Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme, *Nature*, 445, 8, 652-655 (2007).
- [22].C. Nishimura, Y. Ohashi, S. Sato, T. Kato, S. Tabata, C. Ueguchi, Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, 16, 1365-1377 (2004).
- [23].E.F. George, M.A. Hall, G.J. De Klerk, Plant propagation by tissue culture, the Background, *Spinger Publisher* (2008).
- [24].N.Đ. Lượng, L.T.T. Tiên, *Công nghệ tế bào*, Nxb Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh (2006).
- [25].J. Arditti, Fundamentals of Orchid Biology, John Wiley and Sons, New York, 691 (1992).
- [26].P.J. Davies, Plant hormones, *Kluwer Academic Publishers*, 833 (1995).
- [27].D.T. Nhut, P.T.T. Trang, N.H. Vu, D.T.T. Thuy, D.V. Khiem, N.V. Binh, T.T. Van, A wounding method and liquid culture in *Paphiopedilum delenatii* propagation, *Propagation Of Ornamental Plants*, 5, 3, 158-163 (2005).
- [28].R.F. Evert, Esau's plant anatomy. Meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development, John Wiley and Sons, 607 (2006).
- [29].C.G.N. Turnbull, Plant architecture and its manipulation, *Blackwell Publishing* (2005).
- [30].T. Murashige, F.Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassays with *tobacco* tissue cultures, *Physiol. Plant*, 15, 473-479 (1962).
- [31].R.R.B. Leakey, The capacity for vegetative propagation in trees, *Institute of Terrestrial Ecology*, 110-133 (1985).
- [32].M.T.N. Tiếng, N.T.N. Lang, Đ.V. Thanh, N.D. Sanh, B.T. Việt, Kích thích tổ dân cành. Phần II - Cơ chế tạo rễ bất định, *Thông báo Khoa học Đại học Tổng hợp Tp. Hồ Chí Minh*, 4, 93-98 (1980).
- [33].H. Öpik, S.A. Rolfe, The physiology of flowering plants, *Cambridge University Press* (2005).





Hình 1. Hạt lan hài *P. dianthus* lúc bắt đầu nuôi cấy.

Hình 2. Lát cắt dọc hạt lan hài *P. dianthus* lúc bắt đầu nuôi cấy.

Hình 3. Hạt lan hài trước khi nhuộm với thuốc thử I₂KI 1 %.

Hình 4. Hạt lan hài sau khi nhuộm với thuốc thử I₂KI 1 %.

Hình 5. Tiền phôi lan hài sau 4 tuần nuôi cấy, môi trường MS ¼, bổ sung GA₃ 0,001 mg/L, trong tối.

Hình 6. Tiền phôi lan hài sau 4 tuần nuôi cấy, môi trường MS ¼, GA₃ 0,001 mg/L, ngoài sáng.

Hình 7. Phôi lan hài sau 4 tuần tuổi, môi trường MS ¼ có bổ sung GA₃ 0,001 mg/L, trong tối.

Hình 8. Lát cắt dọc phôi lan hài 4 tuần tuổi, môi trường MS ¼ có bổ sung GA₃ 0,001 mg/L, trong tối.

Hình 9. Phôi lan hài sau 8 tuần nuôi cấy, trên môi trường MS ¼ có bổ sung GA₃ 0,001 mg/L, trong tối.

Hình 10. Lát cắt dọc phôi lan hài sau 8 tuần nuôi cấy, môi trường MS ¼ có bổ sung GA₃ 0,001 mg/L, trong tối.

Hình 11. Protocorm màu trắng (có nguồn gốc từ phôi 12 tuần tuổi) sau 4 tuần nuôi cấy, trên môi trường MS ¼ có bổ sung BA 2,0 mg/L và IAA 0,1 mg/L.

Hình 12. Lát cắt dọc protocorm màu trắng (có nguồn gốc từ phôi 12 tuần tuổi) sau 4 tuần nuôi cấy, trên môi trường MS ¼ có bổ sung BA 2,0 mg/L và IAA 0,1 mg/L.

Hình 13. Protocorm màu vàng (có từ phôi 12 tuần tuổi) sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS ¼, với BA 2,0 mg/L và IAA 0,1 mg/L.

Hình 14. Protocorm màu xanh lục sau 16 tuần nuôi cấy trên môi trường MS ¼ có bổ sung BA 2,0 mg/L và IAA 0,1 mg/L.

Hình 15. Lát cắt dọc protocorm màu xanh lục sau 16 tuần nuôi cấy trên môi trường MS ¼ bổ sung BA 2,0 mg/L và IAA 0,1 mg/L.

Hình 16. Chồi lan hài sau 24 tuần nuôi cấy trên môi trường MS ¼, BA 2,0 mg/L và IAA 0,1 mg/L.

Hình 17. Mô phân sinh ngọn chồi lan hài sau 24 tuần nuôi cấy, môi trường MS ¼ có bổ sung BA 2,0 mg/L và IAA 0,1 mg/L.

Hình 18. Protocorm màu trắng sau khi gây vết thương, ở 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS ¼ có bổ sung BA 2,0 mg/L và IAA 0,1 mg/L.

Hình 19. Chồi lan hài xuất hiện trên các vết cắt sau 18 tuần nuôi cấy, trên môi trường MS ¼ có bổ sung BA 2,0 mg/L và IAA 0,1 mg/L.

Hình 20. Cụm chồi lan hài được tạo ra từ protocorm màu trắng bị gây vết thương sau 24 tuần nuôi cấy, trên môi trường MS ¼ có bổ sung BA 2,0 mg/L và IAA 0,1 mg/L.

Hình 21. Cây con lan hài với sự xuất hiện đầy đủ chồi, rễ sau 38 tuần nuôi cấy, trên môi trường MS ¼ có bổ sung BA 2,0 mg/L và IAA 0,1 mg/L.

Hình 22. Lông rễ xuất hiện trên chồi lan hài sau 40 tuần nuôi cấy, môi trường MS ¼ có bổ sung BA 2,0 mg/L, IAA 0,1 mg/L.

Hình 23. Lông rễ lan hài dưới kính hiển vi soi nổi sau 40 tuần nuôi cấy, môi trường MS ¼ có bổ sung BA 2,0 mg/L, IAA 0,1 mg/L.

Hình 24. Cây con lan hài (từ chồi 40 tuần tuổi) sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS ¼ có bổ sung BA 0,1 mg/L và IAA 2,0 mg/L.

Hình 25. Rễ lan hài sau 4 tuần nuôi cấy, trên môi trường MS ¼ có bổ sung BA 0,1 mg/L và IAA 2,0 mg/L.

Hình 26. Cụm chồi lan hài (có nguồn gốc từ cây con 4 tuần tuổi) sau 12 tuần nuôi cấy trên môi trường MS ¼ có bổ sung BA 0,1 mg/L và IAA 2,0 mg/L.

Hình 27. Chồi lan hài được tách từ cụm chồi sau 14 tuần nuôi cấy trên môi trường MS ¼ có bổ sung BA 0,1 mg/L và IAA 2,0 mg/L.

Hình 28. Cây lan hài khỏe mạnh (có nguồn gốc từ chồi 14 tuần tuổi) sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS ¼ có bổ sung BA 0,1 mg/L và IAA 2,0 mg/L.

Hình 29. Cây con lan hài ngoài vườn ươm (có nguồn gốc từ chồi 14 tuần tuổi) sau 28 tuần nuôi cấy trên môi trường MS ¼ có bổ sung BA 0,1 mg/L và IAA 2,0 mg/L.