

# ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT HỮU CƠ BỔ SUNG ĐẾN QUÁ TRÌNH NHÂN NHANH CHỒI, ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI, GIẢI PHẪU VÀ HÀM LƯỢNG SẮC TỐ QUANG HỢP LOÀI LAN HÀI CHÓ ĐỐM (*Paphiopedilum bellatulum*) TRONG NUÔI CÂY *IN VITRO*

Kong Inthachak Maitouy<sup>1</sup>, Ienglorlath Dettaphone<sup>1</sup>, Nguyễn Phương Quý<sup>1\*</sup>,  
Trần Trung Kiên<sup>2</sup>, Vũ Thị Xuân Quyên<sup>3</sup>, Nguyễn Thị Mai Lan<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Hùng Vương, Phú Thọ

<sup>2</sup> Viện Nghiên cứu Ứng dụng và Phát triển, Trường Đại học Hùng Vương, Phú Thọ

<sup>3</sup> Phòng Đào tạo, Trường Đại học Hùng Vương, Phú Thọ

<sup>4</sup> Phòng Công tác chính trị & HSSV, Trường Đại học Hùng Vương, Phú Thọ

Ngày nhận bài: 13/6/2021; Ngày chỉnh sửa: 25/6/2021; Ngày duyệt đăng: 28/6/2021

## Tóm tắt

Các cơ chất hữu cơ được biết có tác dụng thúc đẩy quá trình phát triển của chồi *in vitro* ở một số loài cây trồng trong đó có lan hài. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của ba loại cơ chất hữu cơ là nước dừa, khoai tây và chuối xanh đến sinh trưởng của chồi lan hài chó đốm *in vitro* với hàm lượng nước dừa từ 50ml đến 200ml/l, dịch nghiền khoai tây và chuối xanh với hàm lượng từ 50g đến 200g/l. Tất cả các cơ chất hữu cơ đều có tác động làm tăng sự nhân chồi hơn so với đối chứng, ngoại trừ bổ sung dịch chiết khoai tây ở hàm lượng 200 g/l môi trường nuôi cấy. Trong các cơ chất, nước dừa có hiệu quả thúc đẩy sự nhân chồi hơn so với khoai tây và chuối xanh. Bổ sung nước dừa ở nồng độ 150 ml/l môi trường nuôi cấy có hiệu quả làm tăng sự nhân chồi lớn nhất đạt 2,4 chồi/ mẫu sau 12 tuần nuôi cấy. Bên cạnh đó, các đặc điểm hình thái, giải phẫu và sinh lí chồi *in vitro* lan hài chó đốm cũng đã được xác định lần đầu trong nghiên cứu này.

**Từ khóa:** Lan hài chó đốm (*Paphiopedilum bellatulum*), nhân chồi, cơ chất hữu cơ, hình thái, giải phẫu, sắc tố quang hợp.

## 1. Đặt vấn đề

Loài lan hài chó đốm (*Paphiopedilum bellatulum*) sinh trưởng ở vùng đông bắc Myanmar và rìa khu vực phía tây bắc Thái Lan, một số ít được tìm thấy ở phía bắc Việt Nam. Thông thường, loài lan này sống trên độ cao 1.000 đến 1.500 m so với mực nước biển, trong những khu vực có bóng râm nhẹ của các rừng tạp và cần cỗi, nhưng đôi khi cũng thấy chúng có mặt ở độ cao 340 m. Chúng thường mọc trong những khe nứt và hốc giữa các tảng đá vôi. Các cây khỏe mạnh thường sống ở ngoài bìa, nơi có thể tiếp xúc với nước, ở đó rễ của chúng có thể tiếp cận với đất mùn, lá cây mục và rêu [1]. Loài lan hài chó đốm đã được liệt kê trong Sách Đỏ ở mức xếp hạng loài bị nguy cấp [2].

Phương pháp nhân giống *in vitro* hiện nay được áp dụng phổ biến trong nhân giống nhiều loài thực vật khác nhau nhờ vào các đặc tính ưu việt như hệ số nhân giống lớn, chất lượng cây giống đồng đều, sạch bệnh... [3]. Chính nhờ nhiều ưu điểm này, gần đây, phương pháp nhân giống *in vitro* đã được sử dụng để nhân giống rất nhiều loài lan hài khác nhau [4-6]. Tuy nghiên cứu nhân giống *in vitro* lan hài chó đốm đã được tiến hành [4] nhưng mới chỉ chú ý đến ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng. Trong khi đó, ảnh hưởng của chất hữu cơ đến sự nhân giống *in vitro* loài lan này chưa được tiến hành. Mặc dù, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra các chất hữu cơ như nước dừa có ảnh hưởng đến nhân giống *in vitro* lan hài [7]. Nước dừa chứa nhiều loại chất sinh học khác nhau, bao gồm các

axit amin, vitamin, đường, khoáng chất và chất hormone thực vật và các chất ức chế tự nhiên và các chất điều hòa bao gồm ethylene, ABA, phenol và sắc tố thực vật [8], tất cả đều có thể ảnh hưởng đến sự nảy mầm của hạt hoặc phát triển cây con. Việc bổ sung bột chuối vào môi trường cũng thúc đẩy sự phát triển của chồi và rễ cây con *in vitro* *Paphiopedilum* [9]. Có báo cáo rằng 20g/l khoai tây có thể thúc đẩy sự nảy mầm của *P. bellatulum*, *P. delenatii* và *P. primulinum* [10].

Nghiên cứu này nhằm xác định ảnh hưởng của một số hợp chất hữu cơ đến khả năng nhân chồi *in vitro*, đồng thời xác định một số đặc điểm sinh lý và giải phẫu của cây lan hài chó đốm *in vitro*.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu

Chồi *in vitro* cây lan hài chó đốm được lưu giữ tại Trung tâm Công nghệ Sinh học, Viện Nghiên cứu Phát triển và Ứng dụng, trường Đại học Hùng Vương đạt chiều cao 20-25mm, số lá từ 3-4 lá, rễ cắt bỏ được sử dụng làm vật liệu trong nghiên cứu này.

### 2.2. Bố trí thí nghiệm

Trong nghiên cứu này, các chất hữu cơ bổ sung gồm nước dừa, dịch nghiền khoai tây, dịch nghiền chuối xanh được sử dụng ở để nghiên cứu ảnh hưởng của chúng đối với quá trình nhân chồi *in vitro* cây lan hài chó đốm. Môi trường cơ sở là MS [11] có bổ sung 6 g/l agar, 0,5 g/l than hoạt tính, 20 g/l đường saccharose và 0,5 ml/l TDZ

[7]. Nước dừa được sử dụng ở các nồng độ 50, 100, 150 và 200 ml/l môi trường. Dịch nghiền khoai tây, dịch nghiền chuối xanh được sử dụng ở các nồng độ 50, 100, 150, 200 g/l môi trường. Công thức đối chứng là môi trường cơ sở không bổ sung các chất hữu cơ. Mỗi công thức thí nghiệm có 5 bình thí nghiệm, trong mỗi bình thí nghiệm có ba chồi được cấy với khoảng cách đều nhau.

### 2.3. Phương pháp xác định chỉ tiêu nghiên cứu và xử lý số liệu

## 3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

### 3.1. Ảnh hưởng của chất hữu cơ bổ sung đến sự nhân chồi in vitro lan hài chó đốm

Bảng 1. Số chồi tăng sau 12 tuần nuôi cấy

Cơ chất hữu cơ	Nồng độ	Số chồi tăng sau 12 tuần		
Môi trường cơ sở	-	0,00 <sup>c</sup>	±	0,00
Khoai tây	50 g/l	0,50 <sup>d</sup>	±	0,35
	100 g/l	0,60 <sup>d</sup>	±	0,49
	150 g/l	0,40 <sup>d</sup>	±	0,29
	200 g/l	0,00 <sup>c</sup>	±	0,00
Chuối xanh	50 g/l	1,25 <sup>c</sup>	±	0,43
	100 g/l	1,00 <sup>cd</sup>	±	0,00
	150 g/l	1,00 <sup>cd</sup>	±	0,63
	200 g/l	0,50 <sup>d</sup>	±	0,50
Nước dừa	50 ml/l	0,50 <sup>d</sup>	±	0,50
	100 ml/l	1,75 <sup>b</sup>	±	0,43
	150 ml/l	2,40 <sup>a</sup>	±	0,49
	200 ml/l	0,75 <sup>d</sup>	±	0,43

Chú thích: Trong cùng một cột, chữ cái khác nhau a, b, c... thể hiện sự sai khác ở mức  $\alpha=0,05$

Số chồi mới hình thành được xác định sau 12 tuần nuôi cấy. Chiều cao chồi (mm) được đo từ gốc đến vút ngọn của lá cao nhất, kích thước lá (chiều dài (mm), chiều rộng (mm), diện tích (mm<sup>2</sup>)), được xác định thông qua phần mềm ImageJ. Hàm lượng diệp lục và carotenoid trong mô lá được xác định bằng phương pháp quang phổ khi chiết với dung dịch acetone 80% ở các bước sóng 663, 647 và 470 nm [12]. Các số liệu được tính trung bình, độ lệch chuẩn và kiểm tra sự sai khác có ý nghĩa ở mức 95% với tiêu chuẩn Duncan [12].

Kết quả nghiên cứu trong bảng 1 chỉ ra rằng các chất hữu cơ bổ sung đều có tác động rõ rệt đến sự tăng số chồi *in vitro* lan hài chó đốm. Tuy nhiên, mức độ tác động không giống nhau, số lượng chồi phụ thuộc vào loại cơ chất hữu cơ cũng như nồng độ của từng cơ chất. Cụ thể, ở môi trường cơ sở không bổ sung chất hữu cơ, số lượng chồi *in vitro* không thay đổi sau 12 tuần nuôi cấy. Trong khi đó, khi bổ sung dịch chiết khoai tây ở các nồng độ 50, 100, và 150 g/l môi trường, số chồi tăng lên lần lượt 0,5; 0,6 và 0,4 chồi sau 12 tuần nuôi cấy. Tuy nhiên, bổ sung 200 g/l dịch chiết khoai tây vào môi trường nuôi cấy không đem lại hiệu quả. Khi bổ sung dịch nghiền chuối xanh ở các nồng độ 50, 100, 150 và 200 g/l vào môi trường cho thấy số chồi *in vitro* tăng so với thời gian ban đầu, tương ứng 1,25; 1,00; 1,00 và 0,50 chồi sau 12 tuần nuôi cấy. Hiệu quả kích thích tạo chồi của dịch nghiền chuối xanh cao nhất ở nồng độ 50 g/l môi trường. Khi bổ sung nước dừa vào môi trường, sau 12 tuần, số chồi *in vitro* lan hài chó đốm tăng so với thời điểm ban đầu lần lượt 0,50; 1,75; 2,40 và 0,75 chồi ở các nồng độ 50, 100, 150 và 200 ml/l. Như vậy, nồng độ nước dừa bổ

sung 150 ml/l có hiệu quả tạo chồi *in vitro* lan hài chó đốm cao nhất trong các nồng độ nghiên cứu. Đồng thời, nước dừa ở nồng độ này có hiệu quả cao nhất trong tất cả các công thức thí nghiệm ảnh hưởng của các cơ chất hữu cơ đến sự nhân chồi *in vitro* lan hài chó đốm.

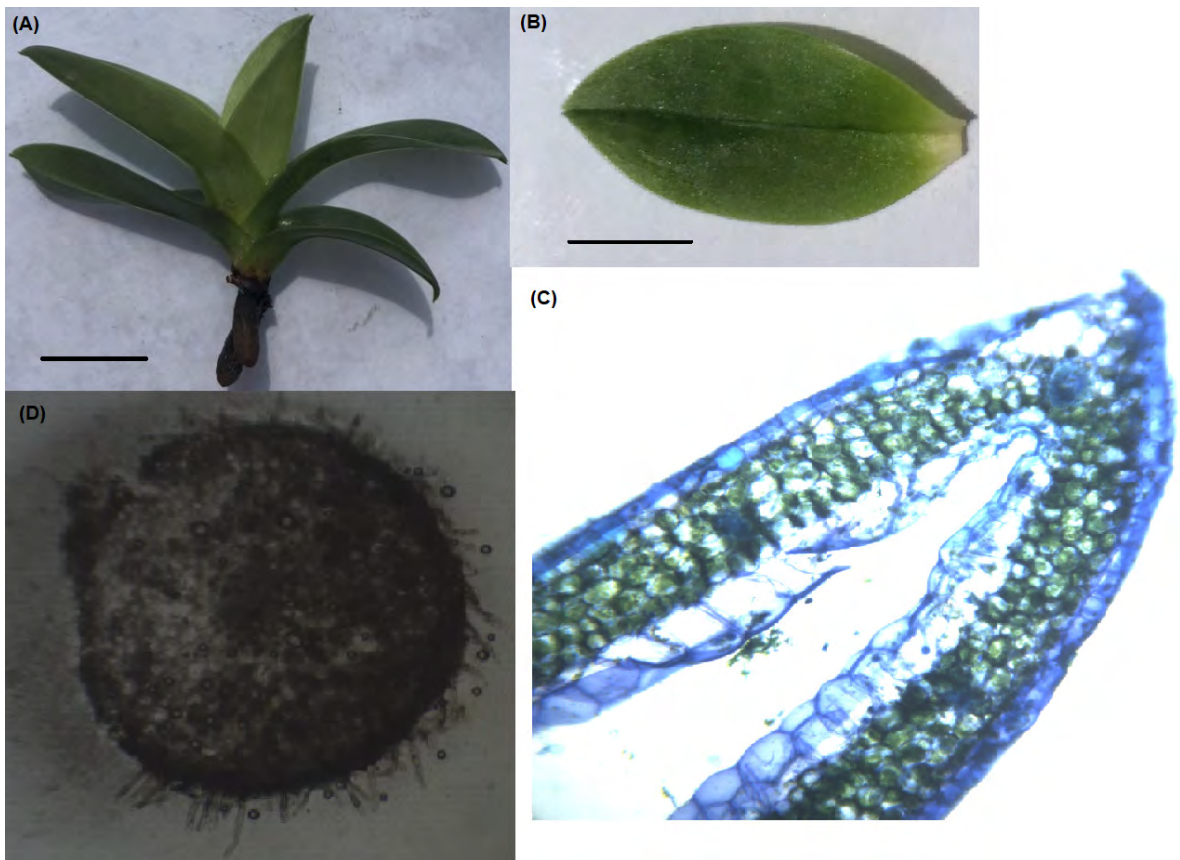
Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Cúc và cộng sự (2014) trên cây hài hồng. Việc bổ sung nước dừa và chuối có hiệu quả đối với sự phát sinh chồi ở cây hài hồng cao hơn so với khoai tây và cao hơn so với không bổ sung cơ chất hữu cơ. Tuy nhiên, hàm lượng dịch nghiền chuối có hiệu quả trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Cúc và cộng sự (2014) chỉ ở mức 20-30 g/l. Hàm lượng nước dừa hiệu quả nhất ở mức 200 ml/l [7].

### 3.2. Đặc điểm hình thái, giải phẫu lan hài chó đốm *in vitro*

Đặc điểm hình thái của chồi *in vitro* lan hài chó đốm đã được khảo sát sau 12 tuần nuôi cấy trên môi trường bổ sung 150ml/l nước dừa thu được kết quả ở bảng 2 và hình 1.

**Bảng 2. Đặc điểm hình thái chồi lan hài chó đốm sau 12 tuần nuôi cấy trên môi trường bổ sung 150ml/l nước dừa**

Đặc điểm	Kích thước
Chiều cao chồi (mm)	29,36 ± 5,03
Độ rộng tán (mm)	49,14 ± 2,95
Chiều ngang lá (mm)	14,50 ± 0,40
Chiều dài lá (mm)	31,45 ± 0,28
Diện tích lá (mm <sup>2</sup> )	330,91 ± 13,95



**Hình 1. Đặc điểm hình thái, giải phẫu chồi *in vitro* lan hài chó đốm sau 12 tuần nuôi cấy trên môi trường bổ sung 150ml/l nước dừa**

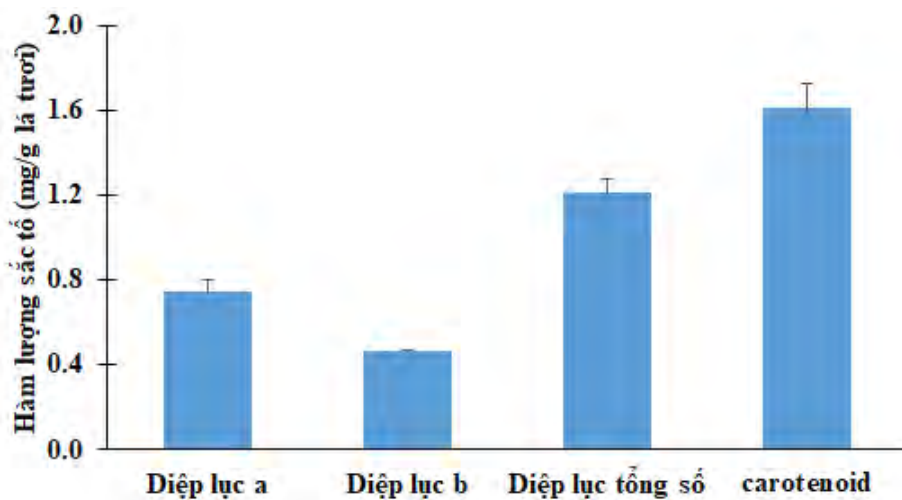
Kết quả ở bảng số liệu cho thấy: Chiều cao chồi trung bình đạt 29,36 mm, độ rộng tán đạt trung bình 14 mm. Chiều ngang lá đạt 14,50 mm, chiều dài lá đạt 31,45 mm, diện tích trung bình của lá đạt 330,91 mm<sup>2</sup>. Kích thước chồi và các cơ quan *in vitro* nhỏ hơn so với kích thước của các cơ quan tương ứng ở cây *ex vitro* trưởng thành.

Bên cạnh đặc điểm hình thái ngoài, đặc điểm giải phẫu lá và rễ cũng đã được khảo sát (Hình 1). Giải phẫu ngang phiến lá (Hình 1C) cho thấy có 3 lớp tế bào mô dậu và lớp tế bào biểu bì trên và biểu bì dưới. Hầu như không quan sát được các tế bào

khí khổng là một đặc điểm đáng chú ý. Có thể với lá cây *in vitro*, lớp cutin kém phát triển nên sự thoát hơi nước diễn ra trên bề mặt lá thuận lợi. Cấu trúc rễ (Hình 1D) cho thấy các lông hút tương đối phát triển.

### **3.3. Đặc điểm hàm lượng sắc tố quang hợp trong mô lá lan hài chó đốm *in vitro***

Hàm lượng sắc tố quang hợp trong mô lá lan hài chó đốm *in vitro* cũng đã được xác định (Hình 3). Hàm lượng diệp lục a, diệp lục b và diệp lục tổng số lần lượt đạt 0,745; 0,462 và 1,21 mg/g lá tươi. Trong khi đó, hàm lượng carotenoid đạt tới 1,610 mg/g lá tươi.



Hình 3. Hàm lượng sắc tố quang hợp trong mô lá lan hài chó đốm *in vitro* 12 tuần trên môi trường bổ sung 150ml/l nước dừa

#### 4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của việc bổ sung các chất hữu cơ gồm nước dừa, dịch nghiền khoai tây và dịch nghiền chuối xanh đến sự nhân chồi *in vitro* của lan hài chó đốm đã được xác định. Trong đó, bổ sung nước dừa ở nồng độ 150 ml/l vào môi trường nuôi cấy có hiệu quả tăng nhân chồi cao nhất, tăng 2,40 chồi/mẫu so với ban đầu. Chiều cao chồi và các chỉ số lá cũng đã được xác định cùng với các đặc điểm giải phẫu như cắt ngang phiến lá và cắt ngang rễ. Hàm lượng sắc tố quang hợp gồm diệp lục a, diệp lục b, diệp lục tổng số lần đầu được xác định ở lá *in vitro* lan hài chó đốm trong nghiên cứu này.

#### Tài liệu tham khảo

- [1] Cash C. (1991). The slipper orchids. Timber Press.
- [2] McGough H. N., Roberts D. L., Brodie C. & Kowalczyk J. (2006). CITES and slipper orchids. Kew Publishing.
- [3] Evans D. E., Coleman J. O. D. & Kearns A. (2020). Plant cell culture. Taylor & Francis.
- [4] Long B., Niemiera A. X., Cheng Z.Y. & Long C. L. (2010). In vitro propagation of four threatened Paphiopedilum species (Orchidaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 101(2), 151-162.
- [5] Zeng Z., Huang W., Wu K., Zhang J., Teixeira da Silva J. A. & Duan J. (2016). In vitro propagation of Paphiopedilum orchids. Critical Reviews in Biotechnology, 36(3), 521-534
- [6] Hoang Thanh Tung, Vu Quoc Luan & Duong Tan Nhut (2020). Some methods in micropropagation and breeding of Paphiopedilum spp, Vietnam Journal of Science and Technology, 58(4), 393-401.
- [7] Nguyễn Thị Cúc, Nguyễn Văn Kết, Dương Tấn Nhựt & Nguyễn Thị Kim Lý (2014). Nghiên cứu ảnh hưởng của một số hợp chất hữu cơ lên quá trình sinh trưởng và phát triển cây lan hài Hồng (Paphiopedilum delenatii) *in vitro*, Tạp chí Sinh học, 36(1se), 250-256.
- [8] Mamaril J. C., Paner E. T., Trinidad L. C., et al (1988). Enhancement of seedling growth with extracts from coconut water. Philippine Journal of Crop Science, 13, 1-7.

- [9] Ernst R. (1980). Seed germination of paphiopedilums. *Orchid Review*, 88, 235-6.
- [10] Lee N. & Lee Y. I. (1999). Effect of capsual maturity, medium composition and liquid culture on seed germination *in vitro* of Paphiopedilum spp.. In: Taiwan Paphiopedilum Society (Ed.), Paphiopedilum in Taiwan II, Chiayi Hsien, 10-11.
- [11] Murashige T. & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3), 473-497.
- [12] Nguyễn Văn Mã, La Việt Hồng & Ong Xuân Phong (2013). Phương pháp nghiên cứu Sinh lý học thực vật. Hà Nội. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội, Hà Nội.

## EFFECTS OF ORGANIC SUPPLEMENTARY ON SHOOT REGENERATION, MORPHOLOGICAL AND ANATOMICAL CHARACTERISTICS AND PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS CONTENT OF *Paphiopedilum bellatulum* IN *IN VITRO* CULTURE

Kong Inthachak Maitouy<sup>1</sup>, Ienglorlath Dettaphone<sup>1</sup>, Nguyen Phuong Quy<sup>1</sup>,  
Tran Trung Kien<sup>2</sup>, Vu Thi Xuan Quyen<sup>3</sup>, Nguyen Thi Mai Lan<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Natural Sciences, Hung Vuong University, Phu Tho

<sup>2</sup> Institute of Applied Research and Development, Hung Vuong University, Phu Tho

<sup>3</sup> Department of Academic Affairs, Hung Vuong University, Phu Tho

<sup>4</sup> Department of Political and Student Affairs, Hung Vuong University, Phu Tho

### Abstract

Organic substrates are known to promote the growth of shoots *in vitro* in a number of plant species, including the slipper orchid group. In this study, we investigated the effects of three types of organic substrates, including coconut water, potato and green banana, on the growth of *in vitro* shoots of *P. bellatulum* with coconut water content from 50ml to 200ml/l, potato and green banana puree with the content from 50g to 200g/l. All organic substances increased shoot multiplication more than the control, except for potatoes at 200 g/l. Among three substrates, coconut water was more effective in promoting shoot multiplication than potatoes and green bananas. In which, coconut water at a concentration of 150 ml/l was most effective to increase shoot multiplication to 2,4 shoots/sample after 12 weeks of culture. In addition, the morphological, anatomical and physiological characteristics of the *in vitro* *P. bellatulum* were also identified for the first time in this study.

**Keywords:** *Paphiopedilum bellatulum*, shoot multiplication, organic substrates, morphology, anatomy, photosynthetic pigments.