

DOI:10.22144/ctu.jvn.2023.067

NHÂN GIỐNG *in vitro* LAN KIM TUYẾN (*Anoectochilus* sp.)

Nguyễn Trần Phước Huy^{1,2*} và Đỗ Thị Mai Trinh³

¹Trung tâm Ươm tạo Doanh nghiệp Nông nghiệp Công nghệ cao Thành phố Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh

³Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại Thành phố Hồ Chí Minh

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Trần Phước Huy (email: nphuy.ahbi@gmail.com)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 05/10/2022

Ngày nhận bài sửa: 14/11/2022

Ngày duyệt đăng: 16/11/2022

Title:

In vitro propagation of *Anoectochilus* sp. by plant tissue culture method

Từ khóa:

Anoectochilus, β – sitosterol, dược liệu, môi trường Murashige & Skoog, nhân giống *in vitro*

Keywords:

Anoectochilus, β – sitosterol, *in vitro* propagation, medicinal herbs, Murashige & Skoog medium

ABSTRACT

Anoectochilus sp., the Orchidaceae family, is one of the precious medicinal plants of Vietnam. Their extract contains several compounds related to cardiovascular functions such as arachidonic acid metabolites, β - sitosterol, etc. The purpose of the study is to establish an *in vitro* propagation procedure for the conservation and development of *Anoectochilus* sp. using the plant growth regulators (6-benzylaminopurine, thidiazudron) combined with the thin cell layer technique have rapidly increased the number of shoots and rooting. The results showed that Murashige & Skoog medium supplemented with 0.5 mg/L 6-benzylaminopurine combined with 0.5 mg/L thidiazudron was optimal for the growth of *Anoectochilus* sp. shoots with 3.67 shoots/sample. The technique of transverse cell slicing combined with light intensity at 2,000 lux resulted in the highest number of shoots arising from the slice with 13.16 shoots/sample. *In vitro* shoots of *Anoectochilus* sp. with optimal rooting on Murashige & Skoog medium reduced by 25% in both macro and microelements. This system could be used for large-scale propagation of *Anoectochilus* sp.

TÓM TẮT

Lan kim tuyến (*Anoectochilus* sp.) thuộc họ Orchidaceae là một trong những loại dược liệu quý của Việt Nam. Dịch chiết chứa các hợp chất liên quan đến chức năng tim mạch như các arachidonic acid, β – sitosterol... Mục đích của nghiên cứu là thiết lập một quy trình nhân giống *in vitro* để bảo tồn và phát triển loài lan kim tuyến bằng cách sử dụng các chất điều hòa sinh trưởng (6-benzylaminopurine, thidiazudron) kết hợp với kỹ thuật cắt lát mỏng tế bào. Kết quả cho thấy môi trường Murashige & Skoog bổ sung 0,5 mg/L 6-benzylaminopurine kết hợp 0,5 mg/L thidiazuron là tối ưu cho sự phát sinh chồi lan kim tuyến với 3,67 chồi/mẫu. Kỹ thuật cắt lát mỏng tế bào theo chiều ngang kết hợp chiếu sáng ở 2.000 lux cho số lượng chồi phát sinh từ lát cắt cao nhất với 13,16 chồi/mẫu. Các chồi *in vitro* lan kim tuyến ra rễ tối ưu trên môi trường Murashige & Skoog giảm 25% cả đa lượng và vi lượng. Các kết quả này có thể sử dụng để nhân giống quy mô lớn cây lan kim tuyến.

1. GIỚI THIỆU

Việt Nam nằm trong vùng nhiệt đới gió mùa nên sở hữu hệ thực vật rất phong phú và đa dạng. Với vị trí thuận lợi về thiên nhiên, nền y học dân tộc nước ta phát triển từ lâu đời, nhiều cây cỏ đã được trồng để làm thuốc, có loại được dùng làm thực phẩm chức năng như các loại trà, các loại sâm... Trong số đó, lan kim tuyến (*Anoectochilus* sp.) là một loại dược liệu quý của Việt Nam (Thuý và ctv., 2015). Lan kim tuyến có chứa các hợp chất chuyển hoá arachidonic acid, liên quan đến chức năng của hệ tim mạch, kháng virus, kháng sưng viêm và các chất bảo vệ gan, chống tăng lipase máu (Mak et al., 1990; Huang et al., 1991; Lin et al., 1993; Du et al., 2001).

Hiện nay, lan kim tuyến được đưa vào danh mục các loài đang nguy cấp thuộc nhóm nghiêm cấm khai thác vì mục đích thương mại (Chính phủ, 2006) và được xếp vào nhóm thực vật rừng đang nguy cấp (EN A1 a, c, d) trong Sách Đỏ Việt Nam năm 2007 trước sự khai thác quá mức của người dân bản địa (Quỳnh, 2012).

Cho đến nay đã có một số công trình nghiên cứu trong và ngoài nước về nhân giống lan kim tuyến như: Shiau et al. (2002), Ket et al. (2003, 2004), Nhut et al. (2006), Phê và ctv. (2010), Thạch và Miện (2012), Anh và ctv. (2013). Tuy nhiên, hiệu quả nhân nhanh loài dược liệu này vẫn còn hạn chế và chưa áp dụng được trên quy mô thương mại. Do vậy, với mục tiêu cải thiện được hệ số nhân giống, đồng thời tạo nguồn cây con khỏe mạnh đáp ứng được thị trường tiêu thụ, giống *in vitro* lan kim tuyến (*Anoectochilus* sp.) được lựa chọn và tiến hành nghiên cứu.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Vật liệu cho nghiên cứu là cây lan kim tuyến (*Anoectochilus* sp.) *in vitro*. Vật liệu sử dụng cho nuôi cấy là đoạn thân mang chồi nách của cây lan kim tuyến *in vitro* có nguồn gốc từ phòng Công nghệ tế bào thực vật – Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy được sử dụng trong nghiên cứu là môi trường khoáng MS (Murashige & Skoog, 1962) bổ sung 8 g/L agar, 30 g/L sucrose. Các chất điều hoà sinh trưởng thực vật (CĐHSTTV) như BA (Benzyl aminopurine, Duchefa Biochemie, Hà Lan), TDZ (Thidiazudron, Duchefa Biochemie, Hà Lan) được bổ sung vào môi trường với các nồng độ khác

n nhau. pH của môi trường được điều chỉnh đạt $5,7 \pm 0,1$ trước khi hấp vô trùng ở nhiệt độ 121°C với áp suất 1,0 atm trong thời gian 20 phút.

Điều kiện phòng nuôi cấy gồm thời gian chiếu sáng: 10 giờ/ngày, cường độ: $2.000 \text{ lux} \pm 200 \text{ lux}$, nhiệt độ: $26 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm: $50 \pm 5\%$.

2.3. Khảo sát ảnh hưởng của TDZ kết hợp BA đến khả năng phát sinh chồi từ đoạn thân mang mầm ngủ cây lan kim tuyến *in vitro*

Cây kim tuyến *in vitro* được chọn đồng đều, chiều cao 4 cm. Thân được cắt 1 đoạn có kích thước 0,5 cm và chữa đọt. Sau đó, mẫu được cấy vào môi trường MS bổ sung BA ($0,25 - 1,0 \text{ mg/L}$) kết hợp với TDZ ($0,25 - 1,0 \text{ mg/L}$), đặt mẫu trên bề mặt thạch, không cắm quá sâu và không để mầm ngủ nằm trong thạch để khảo sát khả năng tái sinh chồi *in vitro* sau 90 ngày nuôi cấy. Chỉ tiêu theo dõi gồm số chồi (chồi/mẫu) và mô tả hình thái chồi.

2.4. Khảo sát ảnh hưởng của kỹ thuật cắt lát mỏng và điều kiện chiếu sáng đến khả năng phát sinh chồi lan kim tuyến *in vitro*

Chồi được chọn đồng đều và có kích thước 0,5 cm từ nghiệm thức tối ưu ở thí nghiệm thứ nhất. Chồi được cắt ra khỏi đoạn thân bằng dao cắt. Sau đó, chồi được cắt lát mỏng (0,2 mm), lát cắt theo chiều dọc đoạn thân của chồi và lát cắt theo chiều ngang đoạn thân của chồi, đặt lát cắt lên bề mặt môi trường thí nghiệm (thao tác tránh gây dập mẫu). Các bình sau khi cấy mẫu được chuyển sang nuôi trong điều kiện có ánh sáng 2.000 lux và ánh sáng 500 lux, theo dõi sau 60 ngày nuôi cấy. Nghiệm thức đối chứng là chồi nguyên vẹn không cắt lát được nuôi cấy trên cùng loại môi trường dưới điều kiện ánh sáng 2.000 lux. Các chỉ tiêu số chồi (chồi/mẫu) và tỉ lệ mẫu hình thành chồi (%).

2.5. Khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sự tăng trưởng lan kim tuyến *in vitro*

Các chồi có kích thước đồng đều được cấy chuyển sang môi trường MS cơ bản không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng trong 30 ngày. Sau đó, các chồi có chiều cao khoảng 2,5 cm được cấy vào các môi trường MS có hàm lượng khoáng khác nhau (môi trường MS cơ bản, môi trường MS giảm 50% cả đa lượng và vi lượng, môi trường MS giảm 25% cả đa lượng và vi lượng, môi trường MS giảm 50% đa lượng, môi trường MS giảm 50% vi lượng). Trong đó, môi trường MS được chọn làm nghiệm thức đối chứng cho các môi trường còn lại. Sau 60

ngày nuôi cấy, các chỉ tiêu về chiều dài rễ (cm), số rễ (rễ/mẫu), số lá (lá/mẫu), chiều cao cây (cm), hình thái cây được ghi nhận.

2.6. Phân tích số liệu

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp lại quan sát 9 mẫu. Kết quả thí nghiệm được xử lý để thu giá trị trung bình và phân tích Duncan’s test bằng phần mềm Statgraphics Centurion XV với mức xác suất có ý nghĩa $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của TDZ kết hợp BA đến khả năng phát sinh chồi từ đoạn thân mang mầm ngủ cây lan kim tuyến *in vitro*

Quá trình phát sinh chồi từ đoạn thân mang mầm ngủ cho kết quả tùy thuộc vào nồng độ chất kích thích sinh trưởng và môi trường nuôi cấy thích hợp.

Theo nghiên cứu của một số tác giả trong và ngoài nước, các tác giả sử dụng đơn lẻ các CDHSTTV mà cụ thể là BA và TDZ nhằm làm tăng hệ số nhân giống. Tuy nhiên, khi kết hợp các CDHSTTV thì khả năng tạo được chồi với hệ số nhân giống cao hơn so với khi sử dụng đơn lẻ. Vì vậy, trong thí nghiệm này, kết quả của việc nghiên cứu sự kết hợp BA và TDZ cho quá trình phát sinh chồi lan kim tuyến theo dõi sau 90 ngày nuôi cấy được thể hiện ở Bảng 1.

Sau 7 ngày nuôi cấy, đoạn thân mang mầm ngủ bắt đầu cảm ứng và có dấu hiệu phình to tại vị trí mầm ngủ (Hình 1A). Sau 30 ngày nuôi cấy, ở vị trí mầm ngủ hầu hết đã bật chồi ở đa số các nghiệm thức, chồi tròn, có màu trắng (Hình 1B). Sau 60 ngày nuôi cấy, chồi có màu xanh và to hơn, có sự tăng trưởng về kích thước chồi (Hình 1C); theo quan sát ở một số nghiệm thức có xuất hiện chồi thứ cấp (Hình 1D). Sau 90 ngày nuôi cấy, tỷ lệ phát sinh chồi ở tất cả các nghiệm thức đạt 100%.

Bảng 1. Ảnh hưởng của TDZ kết hợp BA đến khả năng phát sinh chồi từ đoạn thân mang mầm ngủ lan kim tuyến *in vitro* sau 90 ngày nuôi cấy

Nghiệm thức	Số chồi (chồi/mẫu)	Hình thái chồi
Đối chứng	1,00 ^a ± 0,00	Chồi cao, thân mảnh, có lá.
TDZ 0,25 mg/L + BA 0,25 mg/L	2,18 ^b ± 0,17	Chồi nhỏ, màu xanh nhạt
TDZ 0,25 mg/L + BA 0,50 mg/L	2,52 ^{bc} ± 0,13	Chồi nhỏ, màu xanh nhạt
TDZ 0,25 mg/L + BA 0,75 mg/L	2,29 ^{bc} ± 0,17	Chồi to, màu xanh nhạt
TDZ 0,25 mg/L + BA 1,00 mg/L	2,15 ^b ± 0,17	Chồi to, màu xanh nhạt
TDZ 0,50 mg/L + BA 0,25 mg/L	2,26 ^{bc} ± 0,23	Chồi to, màu xanh đậm
TDZ 0,50 mg/L + BA 0,50 mg/L	3,67 ^d ± 0,51	Chồi to, màu xanh đậm
TDZ 0,50 mg/L + BA 0,75 mg/L	2,33 ^{bc} ± 0,29	Chồi to, màu xanh nhạt
TDZ 0,50 mg/L + BA 1,00 mg/L	2,37 ^{bc} ± 0,23	Chồi to, màu xanh nhạt
TDZ 0,75 mg/L + BA 0,25 mg/L	3,26 ^d ± 0,45	Chồi to, màu xanh nhạt
TDZ 0,75 mg/L + BA 0,50 mg/L	2,26 ^{bc} ± 0,13	Chồi to, màu xanh nhạt.
TDZ 0,75 mg/L + BA 0,75 mg/L	2,30 ^{bc} ± 0,23	Chồi bất thường, phình to, màu xanh nhạt
TDZ 0,75 mg/L + BA 1,00 mg/L	2,48 ^{bc} ± 0,55	Chồi bất thường, phình to, màu xanh nhạt
TDZ 1,00 mg/L + BA 0,25 mg/L	2,45 ^{bc} ± 0,30	Chồi bất thường, phình to, màu xanh nhạt
TDZ 1,00 mg/L + BA 0,50 mg/L	2,37 ^{bc} ± 0,17	Chồi bất thường, phình to, màu xanh nhạt
TDZ 1,00 mg/L + BA 0,75 mg/L	2,67 ^c ± 0,11	Chồi bất thường, nhỏ, màu xanh nhạt
TDZ 1,00 mg/L + BA 1,00 mg/L	2,11 ^b ± 0,11	Chồi bất thường, nhỏ, màu xanh nhạt
CV (%)	11,53	

* Các giá trị theo sau bởi chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 0,05.

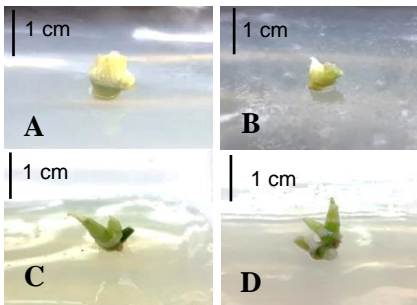
Bảng 1 cho thấy sau 90 ngày nuôi cấy ở môi trường đối chứng MS (không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng) thì chồi bên phát triển và không xuất hiện thêm chồi mới, chồi tăng trưởng cao hơn so với các nghiệm thức còn lại. Điều này có thể là do trong mẫu cây có hàm lượng cytokinin nội sinh, trong môi trường khoáng bổ sung thêm nước dừa nhưng với nồng độ thấp nên đã kích thích tạo chồi. Theo Việt

(2002), auxin được tổng hợp ở ngọn chính và vận chuyển xuống dưới làm cho các chồi bên tích lũy nhiều auxin nên ức chế sinh trưởng và khi phá hủy hiện tượng ưu thế ngọn, lượng auxin tích lũy trong chồi bên sẽ giảm và kích thích chồi bên sinh trưởng.

Khi bổ sung cytokinin vào môi trường nuôi cấy, chồi sẽ kích thích sự hoạt động của chồi bên (Lượng

& Tiên, 2011). Trong thí nghiệm này, khi bổ sung TDZ và BA số lượng chồi đạt cao nhất ở môi trường bổ sung TDZ 0,5 mg/L kết hợp BA 0,5 mg/L với 3,67 chồi/mẫu, chồi phát triển khoẻ, to tròn, có màu xanh đậm và có xu hướng phát triển thành cụm chồi.

Hàm lượng BA thích hợp đã kích thích sự phân chia, phân hóa và gia tăng kích thước của tế bào. Mặt khác, BA còn có tác dụng kích thích tế bào hấp thu nguồn dinh dưỡng từ môi trường nhằm thúc đẩy quá trình tổng hợp protein và nucleic acid thúc đẩy tế bào phát sinh chồi. Bên cạnh đó, TDZ là một hợp chất có hoạt tính mạnh hơn BA. Sự có mặt của TDZ trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng rõ rệt đến quá trình nhân chồi. TDZ có tác dụng rất mạnh trong kích thích sự tạo chồi bất định (Huetteman & Preece, 1993).



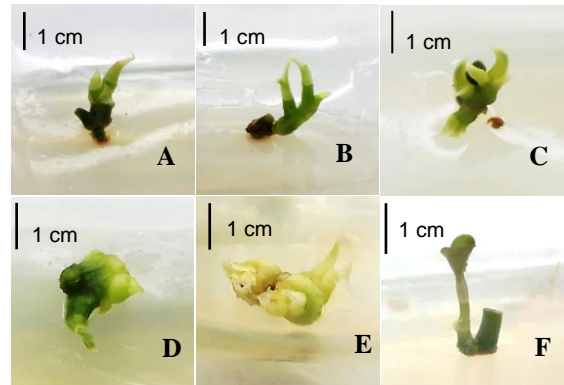
Hình 1. Đoạn thân mang mầm ngủ sau một thời gian nuôi cấy

- A – Mầm ngủ sau 1 tuần nuôi cấy;
- B – Mầm ngủ sau 30 ngày nuôi cấy;
- C – Mầm ngủ sau 60 ngày nuôi cấy;
- D – Chồi thứ cấp sau 60 ngày nuôi cấy.

Khi bổ sung nồng độ TDZ và BA thấp, số chồi/mẫu không đạt được tối ưu, điều này có thể do cytokinin nội sinh và ngoại sinh vẫn chưa đạt nồng độ phù hợp nên hiệu quả kém. Khi tăng nồng độ TDZ và BA lên cao, số chồi giảm dần và hình thái chồi bắt đầu không bình thường (Hình 2D). Theo Cường và ctv. (2015), khi hàm lượng cytokinin quá cao gây nên sự ức chế sinh trưởng của chồi và TDZ được xem là loại cytokinin mạnh, khi mẫu tiếp xúc với nồng độ cao của TDZ trong môi trường nuôi cấy ở thời gian dài có thể gây hiện tượng thủy tinh thể, sự phát triển chồi bất thường khó hình thành rễ sau này.

Tóm lại, môi trường tối ưu cho sự phát sinh chồi từ đoạn thân mang mầm ngủ là môi trường MS bổ sung TDZ 0,5 mg/L, BA 0,5 mg/L kết hợp với 20

g/L sucrose, 100 ml/L nước dừa và 7 g/L agar, pH 5,7 – 5,8 và nuôi cấy ở điều kiện chiếu sáng 2000 lux.



Hình 2. Chồi phát sinh từ đốt thân trong môi trường bổ sung BA và TDZ sau 90 ngày nuôi cấy

- A. TDZ 0,25 mg/L + BA 0,25 mg/L;
- B. TDZ 0,25 mg/L + BA 1,00 mg/L;
- C. TDZ 0,50 mg/L + BA 0,50 mg/L;
- D. TDZ 0,75 mg/L + BA 1,00 mg/L;
- E. TDZ 1,00 mg/L + BA 0,75 mg/L;
- F. Đối chứng (không bổ sung CDHSTTV)

3.2. Ảnh hưởng kỹ thuật cắt lát mỏng và điều kiện chiếu sáng đến khả năng phát sinh chồi lan kim tuyến *in vitro*

Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, vật liệu nuôi cấy được chọn từ nhiều nguồn khác nhau như: đỉnh sinh trưởng, đốt thân, cuống lá ... với các kỹ thuật nuôi cấy khác nhau như nuôi cấy đốt thân đơn, nuôi cấy mô sẹo, nuôi cấy lát mỏng tế bào. Với mục đích gia tăng hệ số nhân chồi, trong thí nghiệm này, kỹ thuật cắt lát mỏng và nuôi cấy trong hai điều kiện ánh sáng 2.000 lux và 500 lux đã được thực hiện. Sau 60 ngày nuôi cấy, kết quả được trình bày trong Bảng 2.

Kết quả sau 60 ngày nuôi cấy ở Bảng 2 cho thấy ảnh hưởng rõ về kỹ thuật cắt lát mỏng và điều kiện chiếu sáng lên sự phát sinh chồi lan kim tuyến *in vitro*. Trong 5 nghiệm thức, nghiệm thức cắt lát ngang và nuôi cấy ở điều kiện 2.000 lux nhìn chung cho kết quả về tỷ lệ phát sinh chồi (100%) và số chồi trung bình (13,16 chồi/mẫu) cao hơn và có ý nghĩa về mặt thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Nghiệm thức đối chứng cho kết quả thấp nhất (3,67 chồi/mẫu).

Bảng 2. Ảnh hưởng của kỹ thuật cắt lát mỏng và điều kiện chiếu sáng đến số lượng chồi lan kim tuyến *in vitro*

Nghiem thuc	Điều kiện chiếu sáng (lux)	Số chồi (chồi/mẫu)	Tỷ lệ phát sinh chồi (%)	Hình thái chồi
Cắt lát dọc	2.000	9,02 ^c ± 1,60	91,1	Chồi to, tròn, có màu xanh nhạt.
Cắt lát dọc	500	6,05 ^{ab} ± 1,39	66,7	Chồi nhỏ, tròn, màu xanh nhạt.
Cắt lát ngang	2.000	13,16 ^d ± 1,70	100	Chồi nhỏ, màu xanh đậm.
Cắt lát ngang	500	8,00 ^{bc} ± 1,18	77,8	Chồi nhỏ, màu xanh nhạt.
Đối chứng	2.000	3,67 ^a ± 0,51	100	Chồi nhỏ, màu xanh nhạt.
CV (%)		11,6		

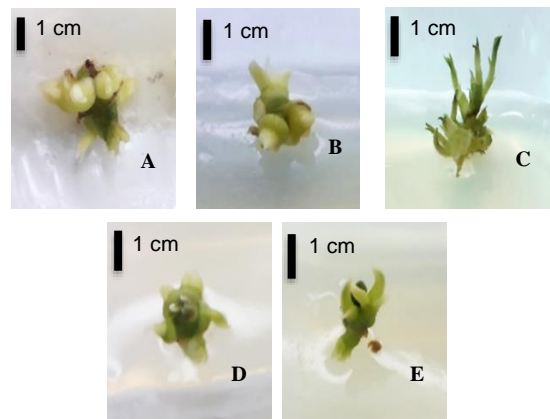
* Các giá trị theo sau bởi chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 0,05.

Khi đặt mẫu cắt lát dọc (ITCL) và cắt lát ngang (tTCL) vào môi trường, sau 7 ngày nuôi cấy mẫu bắt đầu gia tăng kích thước, do việc hấp thụ nước, dinh dưỡng và chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Những tế bào, dưới tác dụng của các yếu tố kích thích như cytokinin (BA và TDZ) được bổ sung cũng như các chất khác trong môi trường nuôi cấy được hấp thụ nhanh hơn tại vị trí có vết thương, cytokinin có tác dụng tăng kích thước tế bào, kích thích nhân nhanh và sinh tổng hợp protein (Việt, 2002).

Các mẫu cắt lát mỏng tế bào thường rất nhạy cảm với điều kiện nuôi cấy và thành phần môi trường nuôi cấy. Một trong những yếu tố vật lý đóng vai trò quan trọng cho sự phát sinh chồi từ lát cắt mỏng là ánh sáng. Khi nuôi ở 2 điều kiện ánh sáng 2000 lux và 500 lux, kết quả ở điều kiện ánh sáng 2000 lux có tỷ lệ tạo chồi và số lượng chồi trên mẫu cao hơn mẫu nuôi cấy ở điều kiện ánh sáng 500 lux. Theo Nam và ctv. (2012), sự phát sinh hình thái thực vật bị ảnh hưởng bởi ánh sáng, yếu tố này ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát sinh chồi bên cạnh quá trình quang hợp. Ánh sáng ảnh hưởng đến carbohydrate, protein và các cơ chất tăng trưởng trong chồi và hầu hết các điều kiện nuôi cấy *in vitro* cung cấp ánh sáng cho sự phát sinh chồi từ mẫu cấy; vai trò ức chế hoặc kích thích dưới điều kiện chiếu sáng khác nhau phụ thuộc vào mối quan hệ giữa các điểm hấp thụ ánh sáng, điểm sinh trưởng của từng loài, từng loại mẫu và độ tuổi của mẫu là khác nhau. Phương và ctv. (2005) cũng có quan điểm tương tự khi cho rằng ánh sáng cần thiết cho quá trình tạo hình dạng cho chồi và có tác dụng lên chiều dài chồi.

Với kỹ thuật cắt lát mỏng, kết quả của 2 cặp nghiệm thức ITCL và tTCL cho thấy mẫu tTCL cho kết quả cao hơn về tỷ lệ tạo chồi và số chồi trên mẫu. Vì mẫu tTCL có sự đồng đều giữa các mẫu, mẫu bao gồm một số lượng nhỏ các dạng tế bào từ các mô khác nhau (biểu mô, vỏ, vùng thượng tầng, mô mạch cũng như nhu mô) và đồng đều nhau về độ tuổi của mẫu nuôi cấy, trong khi ở mẫu ITCL các mẫu nuôi

cấy không có sự tương đồng về các mô tế bào ở các mẫu cấy. Vì vậy, mẫu tTCL sẽ dễ phát sinh chồi và cho số lượng chồi cao hơn mẫu ITCL.



Hình 3. Kết quả thí nghiệm ảnh hưởng của kỹ thuật cắt lát mỏng và điều kiện chiếu sáng đến khả năng phát sinh chồi từ lát mỏng lan kim tuyến *in vitro*

- A. Cắt lát dọc – 2000 lux;
- B. Cắt lát dọc – 500 lux;
- C. Cắt lát ngang – 2000 lux;
- D. Cắt lát ngang – 500 lux;
- E. Nghiệm thức tối ưu ở thí nghiệm tạo chồi

Như vậy, khi sử dụng kỹ thuật tTCL và nuôi cấy mẫu ở điều kiện ánh sáng 2000 lux cho tỷ lệ tạo chồi là 100% và số chồi trung bình là 13,16 chồi/mẫu. Kết quả số chồi trung bình cao gấp 3,59 lần so với sử dụng đoạn thân mang mầm ngủ (nghiệm thức đối chứng có số chồi trung bình là 3,67 chồi/mẫu). Điều này có thể giải thích, các lát cắt có đặc tính chung là “mỏng”, tTCL chứa các lớp tế bào ở nhiều loại mô, đặc tính này giúp mẫu cấy dễ tiếp xúc với các chất dinh dưỡng và chất điều hòa sinh trưởng thực vật, sử dụng nhanh hơn đoạn thân mang mầm ngủ, và mẫu cấy mỏng không bị bao quanh bởi lớp vỏ sẽ làm mẫu dễ phát sinh chồi và số lượng chồi cao hơn.

3.3. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy thích hợp đến sự tăng trưởng lan kim tuyến *in vitro*

Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, thành phần môi trường nuôi cấy đóng vai trò quan trọng đối với mô tế bào. Tùy thuộc vào đặc tính từng loại cây trồng khác nhau mà lựa chọn môi trường nuôi cấy phù hợp để cây tăng trưởng tốt. Môi trường giàu dinh dưỡng đôi khi dẫn đến ngộ độc mô tế bào, ngược lại ở môi trường nghèo dinh dưỡng dẫn đến cây chậm phát triển. Vì vậy, thí nghiệm này được nghiên cứu nhằm tìm ra môi trường thích hợp để lan

kim tuyến tăng trưởng tốt. Sau 60 ngày nuôi cấy và quan sát, kết quả được trình bày trong Bảng 3.

Kết quả khảo sát môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự tăng trưởng lan kim tuyến sau 60 ngày nuôi cấy được trình bày trong Bảng 3. Trong 5 loại môi trường khảo sát, môi trường MS giảm 25% đa lượng và vi lượng nhìn chung cho kết quả về các chỉ tiêu sinh trưởng của cây tốt hơn (chiều dài rễ 1,61 cm, có trung bình 2,09 rễ/cây và 4,22 lá/cây, cây cao trung bình 6,11 cm). Môi trường MS cho kết quả thấp nhất (chiều dài rễ 0,6 cm, có trung bình 1 rễ/cây và 3,23 lá/cây, cây cao trung bình 3,7 cm).

Bảng 3. Ảnh hưởng của hàm lượng khoáng đến sự tăng trưởng lan kim tuyến *in vitro* sau 60 ngày nuôi cấy

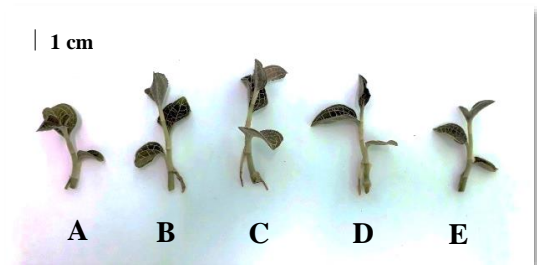
Môi trường	Chỉ tiêu theo dõi (sau 60 ngày)				Hình thái
	Chiều dài rễ (cm)	Số rễ (rễ/mẫu)	Số lá (lá/mẫu)	Chiều cao cây (cm)	
MS	0,60 ^a ± 0,08	1,00 ^a ± 0,00	3,23 ^a ± 0,12	4,65 ^a ± 0,30	Phiến lá hẹp, mỏng; rễ ngắn, có lông tơ.
MS giảm 1/2 đa lượng & vi lượng	1,21 ^b ± 0,11	1,75 ^c ± 0,20	3,59 ^b ± 0,15	5,83 ^b ± 0,27	Phiến lá hẹp, mỏng; rễ có lông tơ.
MS giảm 1/4 đa lượng & vi lượng	1,61 ^c ± 0,07	2,09 ^d ± 0,17	4,22 ^c ± 0,13	6,11 ^b ± 0,19	Phiến lá rộng, dày, rễ màu nâu, có lông tơ.
MS giảm 1/2 đa lượng	1,60 ^c ± 0,07	1,51 ^{bc} ± 0,14	3,58 ^b ± 0,17	5,81 ^b ± 0,35	Phiến lá rộng, mỏng, rễ có lông tơ.
MS giảm 1/2 vi lượng	0,62 ^a ± 0,08	1,36 ^b ± 0,28	3,37 ^{ab} ± 0,11	4,70 ^a ± 0,23	Phiến lá hẹp, mỏng, rễ không có lông tơ.

* Các giá trị theo sau bởi chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 0,05.

Khi giảm 50% vi lượng thì kết quả cho thấy các cây sẽ tăng trưởng tốt hơn. Điều này có thể do nhu cầu của cây lan kim tuyến đối với vi lượng là rất thấp, theo Lương và Tiên (2011), một số nguyên tố vi lượng có nhu cầu nhỏ hơn có thể thay thế dễ dàng bằng sự lẫn tạp chất ngẫu nhiên của chúng trong các thành phần môi trường như agar, các chất bổ sung như nước dừa, chuối ...

Khi giảm 50% đa lượng, thì kết quả cho thấy cây tăng trưởng đồng đều và tốt hơn môi trường có đa lượng cao. Vì khi khoáng đa lượng ở nồng độ cao, vượt quá giới hạn hấp thụ của cây (chưa gây hiệu ứng độc) thì không kích thích mà ngược lại gây ức chế sự tăng trưởng của cây (Việt, 2002).

Ở môi trường MS, cây có phiến lá nhỏ, mỏng; đốt thân dài khoảng 1,0 cm, cây thấp. Theo Việt (2002), mỗi loài cây sẽ cần một liều lượng khoáng nhất định, sự tăng liều dùng của khoáng sẽ không có tác dụng mà ngược lại sẽ làm cây kém sinh trưởng và tác giả cho rằng mọi nguyên tố, kể cả nguyên tố thiết yếu, sẽ gây độc cho tế bào nếu liều dùng quá cao.



Hình 4. Kết quả thí nghiệm khảo sát môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự tăng trưởng lan kim tuyến *in vitro* sau 60 ngày nuôi cấy

- A – Môi trường MS;
- B – Môi trường MS giảm 50% đa lượng và vi lượng;
- C – Môi trường MS giảm 25% đa lượng và vi lượng;
- D – Môi trường MS giảm 50% đa lượng;
- E – Môi trường MS giảm 50% vi lượng.

Xét về hình thái cây, ở môi trường MS giảm 25% đa lượng và vi lượng, cây tăng trưởng tương đối đồng đều, phiến lá rộng, dày, có màu xanh đậm; đốt thân cao khoảng 1,5 cm, rễ có lông tơ và các chỉ tiêu đều tốt hơn các nghiệm thức còn lại. Điều này có thể

là do nhu cầu của cây đối với khoáng là rất thấp và lan kim tuyến sống và phân bố ở nơi nghèo chất dinh dưỡng, hàm lượng khoáng thấp (Phê và ctv., 2010).

Đối với số lượng rễ và chiều dài rễ các môi trường nền khác nhau có ảnh hưởng rõ đến sự phát triển của rễ lan kim tuyến *in vitro*. Môi trường MS giảm 25% đa lượng và vi lượng cho kết quả cao nhất với 2,09 rễ/mẫu; rễ có màu nâu, chắc, khoẻ, rễ dài 1,61 cm. Mặc dù không bổ sung auxin nhưng có xuất hiện rễ, chứng tỏ sự ra rễ có tác động của than hoạt tính bổ sung vào môi trường. Các môi trường khác đều cho các chỉ tiêu về số rễ/mẫu và hình thái rễ thấp hơn. Điều này có thể giải thích do rễ có tác dụng hút nước và chất dinh dưỡng cho cây, mà lan kim tuyến là một loại cây yêu cầu dinh dưỡng thấp,

khi sống ở môi trường nghèo dinh dưỡng rễ lan kim tuyến sẽ kích thích phát triển mạnh hơn và phát triển theo hướng phát triển chiều dài rễ. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Thạch và Miện (2012).

4. KẾT LUẬN

Mẫu đoạn thân mang mầm ngủ cây lan kim tuyến *in vitro* tái sinh chồi tốt nhất trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L BA kết hợp với 0,5 mg/L TDZ. Sử dụng kỹ thuật cắt lát mỏng theo chiều ngang và nuôi trong điều kiện ánh sáng 2.000 lux cho hiệu quả phát sinh chồi từ lát cắt mỏng cao nhất với 13,16 chồi/mẫu. Các chồi tăng trưởng tốt trên môi trường MS giảm 25% cả đa lượng và vi lượng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cường, Đ. M., Luận, V. Q., Cường, N. V., Sang, N. T., Hoàng, N. H., Tâm, H. T., Tuấn, N. X., Hiếu, T., Tùng, H. T., Loan, N. T. K., & Nhật, D. T. (2015). Ảnh hưởng của một số yếu tố lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây lan gấm (*Anoectochilus setaceus* Blume) nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 13(3), 337 - 344.
- Du, X. M., Sun, N. Y., Tamura, T., Mohri, A., Sugiura, M., Yoshizawa, T., Irino, N., Hayashi, J., & Shoyama, Y. (2001). Higher yielding isolation of kinsenoside in *Anoectochilus* and its anti-hyperliposis effect. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24(1), 65-69. <https://doi.org/10.1248/bpb.24.65>
- Huang, D. D., Law, R. C. S., & Mak, O. T. (1991). Effects of tissue cultured *Anoectochilus formosanus* Hay. extracts on the arachidonate metabolism. *Bot. Bull. Acad. Sin*, 32(9), 19.
- Huetteman C. A., & Preece J. E. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Tissue and Organ Culture*, 33, 105 – 119. <https://doi.org/10.1007/BF01983223>
- Ket, N. V., Hahn, E. J., Park, S. Y., Chakrabarty, D., & Paek, K. Y. (2004). Micropropagation of an endangered orchid *Anoectochilus formosanus*. *Biologia plantarum*, 48, 339-344. <https://doi.org/10.1023/B:BIOP.0000041084.77832.11>
- Lin, J. M., Lin, C. C., Chiu, H. F., Yang, J. J., & Lee, S. G. (1993). Evaluation of the anti-inflammatory and liver-protective effects of *Anoectochilus formosanus*, *Ganoderma lucidum* and *Gynostemma pentaphyllum* in rats. *The American journal of Chinese medicine*, 21(01), 59-69. <https://doi.org/10.1142/S0192415X9300008X>
- Lượng, N. Đ., Tiên, L. T. T., (2011). *Công nghệ tế bào*. Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh.
- Mak, O. T., Huang, D. D., & Law, R. C. S. (1990). *Anoectochilus formosanus* Hay. contains substances that affect arachidonic acid metabolism. *Phytotherapy Research*, 4(2), 45-48. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650040202>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nam, N. B., Lâm, N. Đ., & Nhật, D. T. (2012). Ảnh hưởng của loại mẫu cây và hệ thống chiếu sáng đơn sắc lên khả năng tái sinh chồi cây hoa cúc (*Chrysanthemum morifolium* Ramat C. V. "Jimba") nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 50(6), 595 - 606.
- Chính phủ. *Nghị định số 32/2006/NĐ-CP của Chính phủ ngày 30 tháng 3 năm 2006 về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm*. <https://thuvienphapluat.vn/van-ban/Tai-nguyen-Moi-truong/Nghi-dinh-32-2006-ND-CP-quan-ly-thuc-vat-dong-vat-rung-nguy-cap-quy-hiem-10831.aspx>
- Nhut, D. T., Don, N. T., Vu, N. H., Thien, N. Q., Thuy, D. T. T., Duy, N., & Teixeira da Silva, J. A. (2006). Advanced technology in micropropagation of some important plants. *Floriculture ornamental and plant biotechnology*, 2, 325-335.
- Phê, P. V., Trung, N. T., & Duy, V. H. (2010). Đặc điểm hình thái, phân bố của loài lan kim tuyến *Anoectochilus setaceus* Blume ở Vườn Quốc gia Tam Đảo, tỉnh Vĩnh Phúc. *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia, Khoa Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 104 - 109.

- Phượng, L. N., Vệ, N. B., & Nhã, Đ. T. T. (2005). Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng và hàm lượng đường sucrose trong môi trường nuôi cấy đến sự phát triển của chồi dưa hấu tam bội (*Citrullus vulgaris* Schrad.) *in vitro*. *Tạp chí Nghiên cứu khoa học*, 4, 1 - 8.
- Quỳnh, N. N. (2012). Cây Lan Gấm (*Anoectochilus formosanus* Hayata), giá trị kinh tế và tiềm năng phát triển trên vùng đất Tây Nguyên.
- Shiau, Y. J., Sagare, A. P., Chen, U. C., Yang, S. R., & Tsay, H. S. (2002). Conservation of *Anoectochilus formosanus* Hayata by artificial cross-pollination and *in vitro* culture of seeds. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 43.
- Thạch, N. Q., Miện, P. T. C. (2012). Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống loài lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) *in vitro* bảo tồn nguồn dược liệu quý. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 10(4), 597 - 603.
- Thúy, T. T., Gấm, Đ. T., Hưng, N. K., Ngọc, P. B., & Hà, C. H. (2015). Nghiên cứu nhân nhanh *in vitro* loài lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) thông qua cảm ứng tạo protocorm like bodies. *Tạp chí Sinh học*, 37(1), 76 - 83.
- Việt, B. T. (2002). *Sinh lý thực vật đại cương - Phần I. Dinh dưỡng*. Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh.
- Wu, R. Z., Chakrabarty, D., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2007). Micropropagation of an endangered jewel orchid (*Anoectochilus formosanus*) using bioreactor system. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 48(6), 376-380.