

## NGHIÊN CỨU KỸ THUẬT NHÂN GIỐNG LOÀI LAN KIM TUYẾN (*Anoectochilus setaceus* Blume) *IN VITRO* BẢO TỒN NGUỒN DƯỢC LIỆU QUÝ

Nguyễn Quang Thạch<sup>1</sup>, Phí Thị Cẩm Miện<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>*Viện sinh học Nông nghiệp, <sup>2</sup>Khoa Nông học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội*

\*Email: mienbmtvat@gmail.com

Ngày gửi bài: 25.05.2012

Ngày chấp nhận: 25.08.2012

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành nhằm thiết lập quy trình nhân nhanh *in vitro* hoàn chỉnh loài lan Kim tuyến *Anoectochilus setaceus*. Cơ quan vào mẫu phù hợp nhất là thể chồi và mắt đốt ngang thân được khử trùng và đưa vào các môi trường nền khác nhau (MS, Knud, Knudson). Tiếp đó, các chồi và mắt đốt được chuyển sang môi trường nền thích hợp có bổ sung BA, Kinetin,  $\alpha$ NAA trong 4 tuần. Môi trường thích hợp nhất để nhân nhanh thể chồi và mắt đốt ngang thân là Knud\* + 0,5mg/l BAP + 0,3mg/l Kinetin + 0,3mg/l  $\alpha$ NAA + 20g/l sucrose + 0,5g/l than hoạt tính + 7g agar/l cho hệ số nhân chồi là 6,55 chồi/mẫu. Các chồi có chiều cao từ 3-4 cm được sử dụng để ra rễ *in vitro*. Tỷ lệ ra rễ là 100% và số rễ/chồi (4,21 rễ/chồi) đạt cao nhất trên môi trường có bổ sung 1mg/l  $\alpha$ NAA.

Từ khóa: Lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus*), hoóc môn thực vật, hệ số nhân nhanh chồi

### Research on the Micropropagation of the Jewel Orchid (*Anoectochilus setaceus*) to Conserve the Valuable Medicine

#### ABSTRACT

The study was conducted to establish an effective protocol for rapid propagation of jewel orchid, *Anoectochilus setaceus* Blume. The most suitable organs for explants were shoots and stem nodes. They were sterilized and cultivated in many different mediums (MS, Knud, Knudson). Then, they will be transferred to the best medium added BA, Kinetin,  $\alpha$ NAA for 4 weeks. The optimal medium for shoot proliferation was Knud\* 0.5mg/l BAP + 0.3mg/l kinetin + 0.3mg/l NAA + 20g/l sucrose + 0.5g/l charcoal + 7g agar/l. The multiple shoot induction was 6,55 shoots/sample. The shoots had stem length from 3 to 4 centimeters were used to plant in the medium to induced root *in vitro*. The rate of roots induce *in vitro* were 100% and the number of roots per samples is 4.21 roots/samples. The medium was added 1mg/l  $\alpha$ NAA is the best medium for inducing root *in vitro*.

Keywords: Jewel orchids (*Anoectochilus setaceus*), plant hormones, the multiple shoot induction.

#### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan Kim Tuyến - *Anoectochilus setaceus* Blume là một loại thảo dược có giá trị kinh tế cao và khả năng chữa trị các bệnh ung thư, chống tăng huyết áp, lưu thông khí huyết, kháng khuẩn...v.v (Nguyễn Tiến Bản, 2005). Lan Kim Tuyến phân bố rộng ở Việt Nam và cũng được dùng làm cảnh nên chúng đã bị thu hái nhiều đến mức cạn kiệt ngoài tự nhiên (Hoàng Hộ, 2000). Hiện nay, lan Kim Tuyến được cấp bảo thuộc nhóm IA của Nghị định 32/2006/CP, nghiêm cấm khai thác vì mục đích thương mại

và nhóm thực vật rừng đang nguy cấp EN A1a,c,d, trong sách đỏ Việt Nam (Bộ Khoa học và Công nghệ, 2007). Vì vậy, nghiên cứu kỹ thuật nhân giống loài lan Kim Tuyến - *Anoectochilus setaceus* sẽ cung cấp những cơ sở khoa học và thực tiễn nhằm bảo tồn và phát triển loài lan này.

Chi lan Kim Tuyến có 12 loài, trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu xây dựng quy trình nhân nhanh *in vitro* các loài lan Kim Tuyến từ hạt. Chow và cs. (1982), đã nghiên cứu thành công nhân giống loài lan Kim Tuyến *Anoectochilus*

*formosannus* từ hạt với công thức môi trường vào mẫu là: 1/2MS + 0,2% than hoạt tính + 8% dịch chiết chuối. Môi trường được sử dụng để nhân nhanh chồi là: 1/2MS + 0,2% than hoạt tính + 8% dịch chiết chuối + 2mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA. Tsay & cs. (2002) đã cắt các mắt đốt than lấy từ cây *Anoectochilus formosanus* Hayata 2 năm tuổi cấy vào môi trường MS lỏng dung tích 500 ml + 2mg/l BAP + 0,5mg/l NAA + 2% than hoạt tính. Nguyễn Văn Kiệt (2004) cũng đã đưa ra quy trình nhân giống *in vitro* thành công cho loài lan Kim Tuyến *Anoectochilus formosanus* với vật liệu ban đầu là từ chồi đỉnh tại đại học Chungbuk, Hàn Quốc. Môi trường tạo vật liệu khởi đầu là H3 (Hyponex: 6,5N-4,5P-19K 1g/l + 20N-20P-20K 1g/l) + 2g/l peptone). Môi trường nhân nhanh là: H3 + 1mg/l BAP (hoặc 1-2mg/l TDZ) + 1% than hoạt tính. Tuy nhiên, việc nhân nhanh loài lan Kim Tuyến *Anoectochilus setaceus* ở Việt Nam chưa được quan tâm và nghiên cứu nhiều. Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích xây dựng quy trình nhân nhanh chồi *in vitro* loài lan Kim Tuyến *Anoectochilus setaceus* làm cơ sở cho việc nhân nhanh nguồn vật liệu khởi đầu và cung cấp nguồn dược liệu quý.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chồi và mắt đốt ngang thân được thu hái tại vườn quốc gia Tam Đảo, sau đó được rửa nhiều lần trong nước và tiến hành sát khuẩn bề mặt bằng dung dịch etanol 70% trong 10 giây, tiếp đó ngâm trong dung dịch chứa 2% hypoclorite 0,01% trong 10 phút. Cuối cùng, rửa sạch lại bằng nước cất vô trùng.

Mẫu đã khử trùng được cắt lại và cấy vào môi trường MS + 0,5mg/l BA + 0,5% than hoạt tính + 20g/l đường sucrose + 7g agar/l với PH = 5,6.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm được tiến hành tại phòng Công nghệ tế bào Thực vật, Viện Sinh học Nông Nghiệp, trường Đại học Nông Nghiệp Hà Nội, trong thời gian từ tháng 9/2011 - tháng 6/2012.

Nghiên cứu nhân nhanh thể chồi và mắt đốt ngang thân được tiến hành qua 4 thí nghiệm, mỗi thí nghiệm từ 4 - 5 công thức trong đó có công thức đối chứng. Thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ (RCB). Điều kiện nuôi cấy trong tất cả các thí nghiệm là giống nhau. Nhiệt độ nuôi cấy là  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , chiếu sáng 16h, nguồn ánh sáng trắng, pH của môi trường là 5,6. Tiến hành xác định số bình thể chồi tạo thành sau mỗi lần cấy chuyển, số chồi tạo thành, đặc điểm của chồi, thể chồi (chiều cao chồi, số lá/chồi, màu sắc, độ mập...)

Số liệu thí nghiệm được xử lý theo chương trình IRRISTAT.

## 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. Xác định môi trường nền thích hợp cho nuôi cấy mô lan Kim Tuyến (*A. setaceus*)

Thể chồi 4 tuần tuổi từ môi trường vào mẫu được cấy vào các môi trường nền khác nhau là MS (Murashige and Skoog, 1962), Knud\*, Knudson (Knudson, 1946) có bổ sung thêm 20g/l sucrose + 100ml/l ND + 100ml/l dịch chiết khoai tây + 7g agar/l. Kết quả thu được sau 8 tuần nuôi cấy được thể hiện qua bảng 1.

Kết quả thí nghiệm cho thấy môi trường Knud\* là môi trường phù hợp nhất để nhân nhanh Lan Kim Tuyến (*A.setaceus*), có hệ số nhân là 3,63 lần cao hơn rất nhiều so với hai công thức còn lại lần lượt là 2,12 và 2,03 lần. Công thức này cũng cho sự vượt trội về chiều dài và số lá và chất lượng chồi, chồi rất to, khỏe, lá có màu xanh đẹp.

### 3.2. Ảnh hưởng của nhóm chất điều tiết sinh trưởng riêng rẽ và phối hợp đến sự phát sinh hình thái và hệ số nhân

#### **Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của nhóm chất cytokinin đến sự phát sinh hình thái và hệ số nhân**

Knud\* được sử dụng làm môi trường nền cho các thí nghiệm nhân lan tiếp theo, các chồi ngọn và chồi nách được cấy vào môi trường có bổ sung các BAP và kinetin với các nồng độ khác nhau. Kết quả thí nghiệm thu được sau 8 tuần

**Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường nền đến khả năng nhân nhanh chồi, mắt đốt Lan Kim Tuyến**

Môi trường	Số lượng chồi (chồi/mẫu)	Chiều dài chồi (cm)	Số lá/chồi	Đặc điểm thể chồi
Knud*	3,63	3,56	4,12	Mập, xanh
MS	2,12	1,32	1,56	Gầy, xanh nhạt
Knudson C	2,03	2,21	2,35	Bé, xanh nhạt



Knud\*



MS



Knudson

**Hình 1. Ảnh hưởng của môi trường nền đến khả năng nhân nhanh chồi**

nuôi cấy. Kết quả thí nghiệm trên thể hiện rõ BA và kinetin có hiệu quả tích cực nhất trong việc tạo chồi in vitro lan Kim Tuyến BA và kinetin ở nồng độ 1,0mg/l cho hiệu quả rõ rệt

nhất hệ số nhân đạt 5,22 và 4,91 chồi/mẫu. Đặc biệt, chất lượng chồi tốt, mập và có màu xanh đậm. Tại các công thức còn lại cho tỷ lệ chồi dao động từ 2,33 - 4,24 chồi/mẫu.

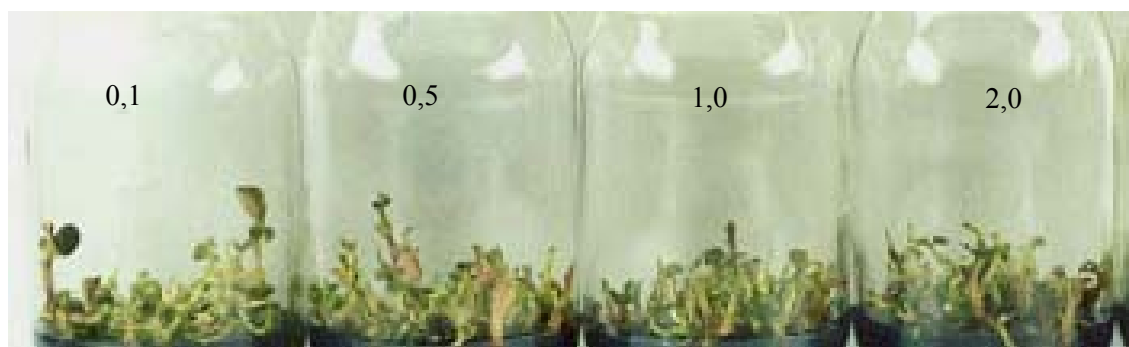
**Bảng 2. Ảnh hưởng của BAP và kinetin đến sự phát sinh hình thái và hệ số nhân**

Cytokinin	Nồng độ (mg/l)	Số chồi (chồi/mẫu)	Số đốt (đốt/mẫu)	Chiều dài chồi (cm)	Đặc điểm chồi
Đối chứng	0	1,22	1,56	2,32	Chồi gầy, xanh nhạt
BAP	0,1	2,45	2,16	3,02	Chồi yếu, xanh nhạt
	0,5	3,91	2,33	3,15	Chồi khỏe, xanh đậm
	1,0	5,22	2,92	3,23	Chồi khỏe, xanh đậm
	2,0	4,24	2,35	3,01	Chồi xanh nhạt, có lông tơ
CV (%)		5,5	4,2	3,7	
LSD <sub>0,05</sub>		1,0	0,3	0,2	
Kinetin	0,1	2,33	1,98	2,45	Chồi yếu, xanh nhạt
	0,5	4,24	2,45	3,04	Chồi khỏe, xanh đậm
	1,0	4,91	2,68	3,23	Chồi khỏe, xanh đậm
	2,0	3,21	2,02	3,09	Chồi xanh nhạt
CV (%)		5,2	4,6	4,1	
LSD <sub>0,05</sub>		0,6	0,7	0,5	

Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống loài lan Kim Tuyền (*Anoectochilus setaceus* Blume) *in vitro* nhằm bảo tồn nguồn dược liệu quý



Hình 2. Ảnh hưởng của kinetin



Hình 3. Ảnh hưởng của BAP

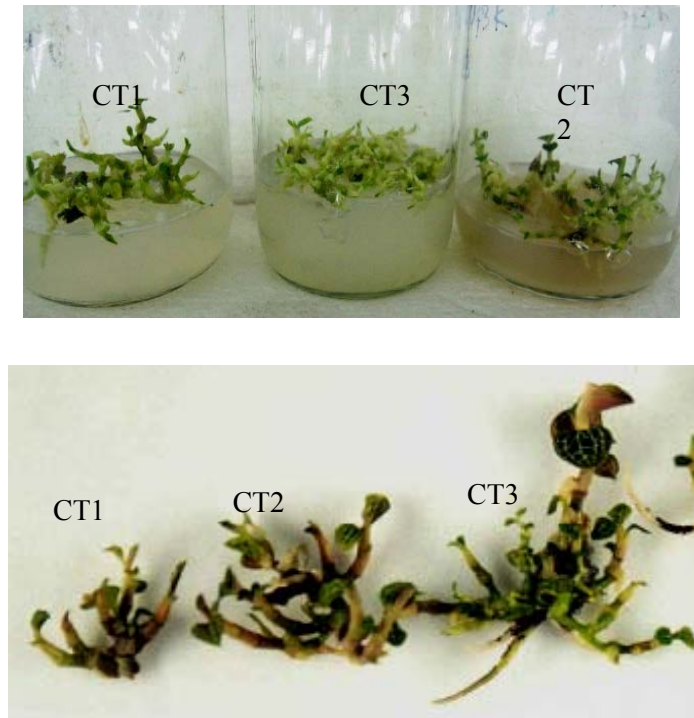
**Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của sự phối hợp 2 nhóm chất là auxin và cytokinin tới sự phát sinh hình thái và hệ số nhân**

Các chồi phụ và chồi bất định được cấy vào môi trường Knud\* + phối hợp chất điều tiết sinh trưởng với các nồng độ khác nhau + 20g/l ND + 100ml/l dịch chiết khoai tây + 7g agar/l. Kết

quả thí nghiệm sau 8 tuần cho thấy công thức Knud\* + 0,5mg/l BA + 0,3kinetin + 0,3mg/l NAA + 20g/l sucrose + 20g/l ND + 5% than hoạt tính + 7g agar/l cho hệ số nhân chồi cao nhất đạt 6,55 chồi/mẫu, chất lượng chồi thu được rất đẹp, màu sắc lá xanh đậm, thân mập, to và khỏe (Bảng 3).

**Bảng 3. Ảnh hưởng của sự phối hợp auxin và cytokinin đến sự phát sinh hình thái**

Công thức (mg/l)	Số chồi (chồi/mẫu)	Số đốt (đốt/mẫu)	Chiều dài chồi (cm)	Đặc điểm chồi
0,5BA +0,3 Kinetin (CT1)	4,67	2,45	3,12	Chồi xanh đậm, lá tương đối khỏe
CV (%)	4,7	5,2	5,0	
LSD <sub>0,05</sub>	0,5	0,6	0,8	
0,3BA + 0,5 Kinetin (CT2)	4,32	2,54	3,22	Chồi xanh đậm, lá rất khỏe
CV (%)	4,9	5,5	5,0	
LSD <sub>0,05</sub>	0,6	0,7	0,9	
0,5BA +0,3 Kinetin + 0,3 NAA (CT3)	6,55	2,77	3,52	Chồi xanh đậm, lá khỏe
CV (%)	5,5	4,0	4,5	
LSD <sub>0,05</sub>	0,5	0,6	0,4	



**Hình 4. Ảnh hưởng của sự phối hợp auxin và cytokinin tới hệ số nhân chồi**

**3.3. Ảnh hưởng của IBA và NAA tới sự hình thành rễ lan Kim Tuyến**

Để cảm ứng tạo rễ, các chồi lan Kim Tuyến có chiều cao 3 - 4cm được chuyển sang môi trường có bổ sung chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm auxin. Kết quả thu được sau 8 tuần

nuôi cấy có sử dụng 2 phytohormon thuộc nhóm auxin là  $\alpha$ NAA và IBA (Bảng 4). Chồi chính và các mắt đốt được dùng làm vật liệu vào mẫu cho thí nghiệm này. Công thức thí nghiệm chung là Knud\* + auxin + 20g/l sucrose + 100ml/l ND + 5% than hoạt tính + 7g agar/l.

**Bảng 4. Ảnh hưởng của NAA và IBA tới sự phát sinh rễ loài lan Kim Tuyến**

Auxin (mg/l)	Chiều dài chồi (cm)	Số lượng chồi (chồi/mẫu)	Số lượng đốt (đốt/mẫu)	Chiều dài rễ (cm)	Số lượng rễ (rễ/mẫu)	Đặc điểm chồi
Đối chứng	3,32	1,31	2,11	0,92	2,04	Chồi xanh nhạt, lá bé
IBA 0,5	4,12	1,27	2,33	1,11	2,43	Chồi xanh nhạt, có lông tơ
1,0	3,71	1,19	2,54	0,89	2,11	Chồi xanh nhạt
1,5	3,55	1,43	2,66	0,99	1,98	Chồi xanh nhạt, lá bé
2,0	3,23	1,26	2,41	1,04	1,83	Chồi xanh nhạt, lá bé
3,0	2,12	1,32	2,58	1,18	1,71	Chồi xanh nhạt, lá bé
$\alpha$ NAA 0,5	3,23	2,06	2,55	1,55	3,72	Chồi bé, màu xanh nhạt
1,0	3,41	2,54	2,87	1,34	4,21	Chồi bé, màu xanh nhạt
1,5	3,33	2,76	2,31	0,81	3,42	Chồi bé, màu xanh nhạt
2,0	3,37	4,11	1,98	1,31	3,33	Chồi bé, màu xanh nhạt
3,0	3,67	3,65	1,79	1,11	3,21	Chồi bé, màu xanh nhạt

Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống loài lan Kim Tuyền (*Anoectochilus setaceus* Blume) *in vitro* nhằm bảo tồn nguồn dược liệu quý



Đ/C                      0,5                      1,0                      1,5                      2,0                      3,0 (mg/l)



Đ/C                      0,5                      1,0 (mg/l)

Ảnh hưởng của IBA



1,5                      2,0                      3,0 (mg/l)

Ảnh hưởng của  $\alpha$ NAA

**Hình 5. Ảnh hưởng của IBA và  $\alpha$ NAA tới sự hình thành rễ**

Thí nghiệm cho thấy IBA và  $\alpha$ NAA ít ảnh hưởng đến sự phát sinh chồi. IBA có nồng độ từ 0,5 - 1,0mg/l và  $\alpha$ NAA 1,0mg/l có tác dụng sản sinh rễ nhưng  $\alpha$ NAA có hiệu quả hơn rất nhiều so

với IBA với trung bình 4,21 rễ/mẫu. Tuy nhiên chất lượng cây chưa thật tốt, hầu hết các mẫu đều cho cây hơi gầy và lá có màu xanh nhạt. Chất lượng lá ở cây bổ sung IBA tốt hơn so với  $\alpha$ NAA.

#### 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

##### 4.1. Kết luận

Môi trường thích hợp nhất để thực hiện nhân nhanh *in vitro* lan kim tuyến là: Knud\* + 0,5mg/l BA + 0,3Kinetin + 0,3mg/l NAA + 20g/l Sucrose + 20g/l ND + 100ml/l dịch chiết khoai tây + 7g agar/l.

Môi trường thích hợp nhất cho sự hình thành rễ tạo cây hoàn chỉnh là: Knud\* + 0,5-1,0 mg/l IBA hoặc 1,0mg/l NAA + 20g/l Sucrose + 100ml/l ND + 5% than hoạt tính + 7g agar/l.

##### 4.2. Đề nghị

Cần tiếp tục tiến hành nghiên cứu các điều kiện ra ngôi thích hợp nhất cho cây con *in vitro* lan Kim Tuyến và đưa vào sản xuất trên quy mô công nghiệp nhằm đáp ứng được nhu cầu sử dụng lan Kim Tuyến hiện nay.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Tiến Bản (chủ biên) (2005). Danh lục các loài thực vật Việt Nam, Tập 3, Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.

Bộ Khoa học và Công nghệ (2007). Sách Đỏ Việt Nam (phần thực vật), Nxb. Khoa học Tự nhiên & Công nghệ, Hà Nội.

Chính Phủ Nước Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (2006). Nghị định số 32/2006/NĐ-CP.

Phạm Hoàng Hộ (2000). Cây cỏ Việt Nam, Quyển 3, Nxb. Trẻ, Tp. Hồ Chí Minh.

Nguyễn Đức Thành (2000). Nuôi cấy mô - tế bào thực vật - Nghiên cứu ứng dụng, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.

Nguyễn Thanh Tùng, Nhân nhanh *in vitro* cây Mỹ Dung dạ lan (*Vanda denisoniana* Benson), Báo cáo Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc, 452-455, 2009.

Van Kiet Nguyen (2004). Effect of Environmental Conditions on *in vitro* and *Ex Vitro* Growth of Jewel Orchid *Anoectochilus formosanus* Hayata, Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy in Agriculture, The Graduate School of Chungbuk National University.

Averyanov L.V, The Orchids of Vietnam Illustrated Survey, Part 1 Subfamilies Apostasioideae and Spiranthoideae, Turczaninowia, 11(1) : 95-97, 2008.

Murashige T and F.Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, plants physiol. 15: 473-497.