

Nghiên cứu kỹ thuật nhân nhanh chồi In Vitro loài Lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.

Phùng Văn Phê¹, Nguyễn Thị Hồng Gấm¹, Nguyễn Trung Thành^{2,*}

¹Khoa Lâm học, Trường Đại học Lâm nghiệp, Xuân Mai, Chương Mỹ, Hà Nội

²Khoá Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 15 tháng 11 năm 2010

Tóm tắt. Bài báo trình bày kết quả nghiên cứu nhân nhanh chồi in vitro loài Lan kim tuyến - *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. Môi trường phù hợp nhất để nhân nhanh chồi Lan kim tuyến in vitro là Knud*. Thể chồi 8 tuần tuổi từ phôi hạt chín và chồi từ thể chồi cao từ 2-3 cm là phù hợp nhất để nhân nhanh trong môi trường thích hợp Knud* bổ sung 0,5 mg/l BAP + 0,3 mg/l Kinetin + 0,3 mg/l NAA + 100 ml/l ND + 100 g/l dịch chiết khoai tây + 20 g/l sucrose + 7 g/l agar + 0,5 g/l AC.

Từ khóa: Chồi, Lan kim tuyến, in vitro, nhân nhanh.

1. Đặt vấn đề

Lan kim tuyến - *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. thuộc họ Lan - Orchidaceae, có phân bố rộng ở hầu hết các tỉnh Việt Nam [1-11]. Là một loại thảo dược có giá trị và tiềm năng rất lớn, đồng thời cũng được dùng làm cảnh nên Lan kim tuyến đã bị thu hái nhiều đến mức cạn kiệt ngoài tự nhiên [2]. Hiện nay, Lan kim tuyến được cấp báo 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 [3,4]. Vì vậy, nghiên cứu kỹ thuật nhân giống loài Lan kim tuyến - *Anoectochilus roxburghii* được triển khai sẽ cung cấp những cơ sở khoa học và thực tiễn nhằm bảo tồn và phát triển loài được liệt nguy cấp, quý hiếm này. Bài báo này giới thiệu kết quả nghiên cứu kỹ thuật nhân

nhanh chồi In vitro loài Lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl..

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Thể chồi được tạo ra từ phôi hạt chín và chồi được tái sinh từ thân ngầm, thân khí sinh của cây Lan kim tuyến - *Anoectochilus roxburghii* (thu thập trong năm 2008, 2009 tại Vườn Quốc gia Ba Vì, Hà Nội) được tạo ra tại Trung tâm Giống & Công nghệ sinh học, Trường Đại học Lâm nghiệp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- **Bố trí thí nghiệm:** Nghiên cứu nhân nhanh chồi/thể chồi In vitro loài Lan kim tuyến trong các điều kiện khác nhau về độ tuổi thể chồi, nguồn gốc chồi, chiều cao chồi và môi trường

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-4-38582178.
E-mail: thanhntsh@gmail.com

nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy được sử dụng cho các thí nghiệm này bao gồm MS, Knudson, Knud* và Hyponex được bổ sung một số chất điều hòa sinh trưởng và phụ gia khác. Thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ (RCB), lặp lại 3 lần. Khi nghiên cứu ảnh hưởng của một yếu tố nào đó thì không chế các yếu tố khác là đồng nhất. Dung lượng mẫu quan sát là 30 cho mỗi công thức thí nghiệm.

- *Thu thập số liệu*: xác định số bình thể chồi tạo được 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, chiều dài, v.v.)

- *Xử lý số liệu*: xác định hệ số nhân nhanh thể chồi, hệ số nhân nhanh chồi, chiều dài chồi

tăng thêm theo các phương pháp thống kê sinh học, phân tích phương sai một, hai nhân tố.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy và tuổi thể chồi đến khả năng nhân nhanh thể chồi

- *Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng nhân nhanh thể chồi*: Thể chồi 8 tuần tuổi được chọn để cấy vào các môi trường nuôi cấy là Knudson, Knud* và Hyponex bổ sung thêm: 0,5 mg/l BAP + 0,3 mg/l Kinetin + 0,3 mg/l NAA + 100 ml/l ND + 100 g/l dịch chiết khoai tây + 20 g/l sucrose + 7 g/l agar. Kết quả thu được sau 4 tuần được thể hiện qua Bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng nhân nhanh thể chồi

Môi trường	Hệ số nhân nhanh thể chồi (lần)	Đặc điểm thể chồi
Knudson	3,33	Thể chồi khá mập, xanh nhạt, xuất hiện ít lông tơ ở gốc thể chồi
Knud*	5,33	Thể chồi mập, xanh, xuất hiện một số lông tơ từ gốc thể chồi
Hyponex	2	Thể chồi bé, xanh nhạt, không xuất hiện lông tơ ở thân

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy môi trường Knud* cho hệ số nhân nhanh thể chồi cao nhất là 5,33 lần, cao hơn nhiều so với hai công thức còn lại lần lượt là 3,33 lần đối với môi trường Knudson và 2 lần đối với Hyponex; chất lượng thể chồi ở môi trường Knud* cũng thể hiện rõ sự vượt trội so với các công thức môi trường còn lại. Như vậy, công thức môi trường Knud* là thích hợp nhất để nhân nhanh thể chồi của lan Kim tuyến.

- *Ảnh hưởng của tuổi thể chồi*: Thể chồi từ phơi hạt chín được dùng làm vật liệu nghiên cứu cho thí nghiệm này. Tuổi thể chồi được tính từ lúc bắt đầu gieo phơi vào môi trường nuôi cấy. Thể chồi ở 6 tuần tuổi, 8 tuần tuổi và 10 tuần tuổi được cấy vào môi trường nhân nhanh thể chồi Knud* cùng bổ sung 0,5 mg/l BAP + 0,3 mg/l Kinetin + 0,3 mg/l NAA + 100 ml/l ND + 100 g/l dịch chiết khoai tây + 20 g/l sucrose + 7 g/l agar. Kết quả thu được sau 04 tuần được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tuổi thể chồi đến khả năng nhân nhanh

Tuổi thể chồi	Đặc điểm thể chồi	Hệ số nhân thể chồi (lần)
6 tuần	Thể chồi khá nhiều, nhỏ, trắng hơi xanh	4,06
8 tuần	Thể chồi nhiều, mập, khá xanh, xuất hiện một số lông tơ mọc từ gốc thể chồi	5,33
10 tuần	Thể chồi nhiều, mập, có lông tơ xuất hiện. Xanh đậm hơn thể chồi 8 tuần tuổi.	3,17

Kết quả ở Bảng 2 chỉ rõ thể chồi 8 tuần tuổi là thích hợp nhất để nhân nhanh, với hệ số nhân cao nhất là 5,33 lần; tiếp đến là thể chồi 6 tuần tuổi, với hệ số nhân là 4,06 lần; cuối cùng là thể chồi 10 tuần tuổi với hệ số nhân thấp nhất là 3,17 lần.



Hình 1. Thể chồi Lan kim tuyến 8 tuần tuổi.

Như vậy với Lan kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* thì tuổi thể chồi thích hợp nhất cho nhân nhanh là 8 tuần, cho hệ số nhân nhanh cao đồng thời thể chồi tạo ra có chất lượng tốt.

3.2. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng nhân nhanh và kích thích tăng trưởng chồi

- Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng nhân nhanh chồi: Chồi từ thể chồi được chọn để cấy vào các môi trường nuôi cấy là MS, Knudson và Knud* cùng bổ sung 0,5 mg/l BAP + 0,3 mg/l Kinetin + 0,3 mg/l NAA + 100 ml/l ND + 100 g/l dịch chiết khoai tây + 20 g/l sucrose + 7 g/l agar. Kết quả nghiên cứu sau 4 tuần được thể hiện qua Bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng nhân nhanh chồi

Môi trường	Hệ số nhân nhanh chồi (lần)	Số đốt thân trung bình	Đặc điểm của chồi
MS	2,33	3	Chồi khá mập, lá xanh nhạt, đốt thân ngắn
Knud*	3	3	Chồi mập, lá xanh đậm, đốt thân ngắn
Knudson	1,73	2	Chồi mảnh, lá xanh nhạt, đốt thân ngắn

Sau 4 tuần nuôi cấy số đốt thân của chồi hầu như không đổi, các chồi cao lên không đáng kể, các chồi nhân nhanh theo hướng tạo đa chồi là chính. Trong ba công thức môi trường nghiên cứu, môi trường Knud* cho hệ số nhân cao nhất là 3 lần và chất lượng chồi là tốt nhất. Chồi mập, lá xanh đậm, đốt thân ngắn.

- Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng kích thích tăng trưởng chồi: chồi từ

thể chồi, có chiều cao 2-3 cm, có 2-3 đốt thân và 1-2 lá hoàn chỉnh, được chọn để cấy vào các môi trường nuôi cấy là MS, Knudson và Knud* cùng bổ sung 0,3 mg/l BAP + 0,1 mg/l Kinetin + 0,1 mg/l NAA + 100 ml/l ND + 100 g/l dịch chiết khoai tây + 20 g/l sucrose + 7 g/l agar để kích thích tăng trưởng chồi. Kết quả nghiên cứu sau 4 tuần được thể hiện qua Bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng kích thích tăng trưởng chồi

Môi trường	Chiều cao chồi ban đầu (cm)	Chiều cao chồi tăng thêm (cm)	Đặc điểm chồi
MS	2,28	1,23	Chồi mập, lá xanh đậm, đốt thân dài
Knud*	2,27	1,23	Chồi mập, lá xanh đậm, đốt thân dài
Knudson	2,31	0,87	Chồi mảnh, lá xanh nhạt, đốt thân ngắn

Kết quả nghiên cứu ở Bảng 4 cho thấy môi trường MS và Knud* cho hiệu quả tương đương nhau, chiều dài chồi tăng thêm được 1,23 cm, thể chồi mập, lá xanh đậm và đốt thân dài. Tuy nhiên, trong cả 2 nội dung nghiên cứu về nhân nhanh chồi thì môi trường Knud* cho hiệu quả tốt hơn môi trường MS. Vậy môi trường Knud* được chọn là môi trường tốt nhất cho nhân nhanh và kích thích tăng trưởng thể chồi và chồi Lan Kim tuyến.

3.3. Ảnh hưởng của loại chồi và chiều cao đến khả năng nhân nhanh

Bảng 5. Ảnh hưởng của chiều cao chồi đến khả năng nhân nhanh theo hướng tạo đa chồi

Loại chồi	Công thức thí nghiệm	Chiều cao chồi (cm)	Hệ số nhân chồi (lần)	Đặc điểm chồi mới phát sinh
Chồi ngọn	I	1 - 2	1,20	Chồi có 1 - 2 đốt dài
	II	2 - 3	2,00	Chồi có 1 - 2 đốt dài
	III	3 - 4	2,00	Chồi có 1 - 2 đốt dài
Chồi nách	IV	1 - 2	3,00	Chồi có 1 - 2 đốt ngắn
	V	2 - 3	4,00	Chồi có 1 - 2 đốt ngắn
	VI	3 - 4	4,00	Chồi có 1 - 2 đốt ngắn
	VII	1 - 2	3,30	Chồi có 1 - 2 đốt ngắn
Chồi từ thể chồi	VIII	<u>2 - 3</u>	<u>5,17</u>	Chồi có 1 - 2 đốt ngắn
	IX	3 - 4	4,53	Chồi có 1 - 2 đốt ngắn

- Nhân nhanh chồi theo hướng tạo nhiều đốt: Lan kim tuyến là cây cỏ, thân chia nhiều đốt, tại các đốt có khả năng tái sinh để hình thành chồi mới. Vì vậy, ngoài việc nghiên cứu nhân chồi theo hướng tạo đa chồi, chúng tôi còn thực hiện nhân chồi theo hướng kéo dài làm tăng số đốt, từ đó cắt đốt để tạo hệ số nhân. Các

- Nhân nhanh chồi theo hướng tạo đa chồi: Các chồi có nguồn gốc, chiều cao khác nhau cùng được nuôi cấy trên môi trường Knud* bổ sung 0,5 mg/l BAP + 0,3 mg/l Kinetin + 0,3 mg/l NAA + 100 ml/l ND + 100 g/l dịch chiết khoai tây + 20 g/l sucrose + 7 g/l agar + 0,5 g/l AC. Kết quả thu được sau 04 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 05. Kết quả ở Bảng 5 đã chỉ rõ, chồi từ thể chồi có chiều cao từ 2-3 cm là phù hợp nhất trong nhân nhanh theo hướng tạo đa chồi, với hệ số nhân chồi cao nhất là 5,17 lần.

chồi có nguồn gốc và chiều cao khác nhau cùng được nuôi cấy trên môi trường Knud* bổ sung 0,5 mg/l BAP + 0,3 mg/l Kinetin + 0,3 mg/l NAA + 100 ml/l ND + 100 g/l dịch chiết khoai tây + 20 g/l sucrose + 7 g/l agar + 0,5 g/l AC. Kết quả nghiên cứu thu được sau 4 tuần nuôi cấy trình bày ở Bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của chiều cao chồi đến khả năng nhân nhanh theo hướng tạo nhiều đốt

Loại chồi	Công thức thí nghiệm	Chiều cao chồi (cm)	Hệ số nhân chồi (lần)	Đặc điểm chồi mới phát sinh
Chồi ngọn	I	1 - 2	2,30	Chồi có 1 - 2 đốt dài
	II	2 - 3	2,67	Chồi có 2 - 3 đốt dài
	III	3 - 4	2,43	Chồi có 2 - 3 đốt dài
Chồi nách	IV	1 - 2	1,13	Chồi có 1 đốt ngắn
	V	2 - 3	1,40	Chồi có 1 - 2 đốt ngắn
	VI	3 - 4	1,27	Chồi có 3 - 4 đốt ngắn
Chồi từ thể chồi	VII	1 - 2	2,67	Chồi có 2- 3 đốt ngắn
	VIII	2 - 3	3,37	Chồi có 3 - 4 đốt dài
	IX	3 - 4	3,27	Chồi có 3 - 4 đốt dài

Kết quả nghiên cứu khẳng định trong nhân nhanh chồi theo hướng tạo nhiều đốt thì chồi từ thể chồi, có chiều cao từ 2-3 cm là phù hợp nhất, hệ số nhân chồi cao nhất là 3,37 lần. Vậy chồi từ thể chồi, có chiều cao 2-3 cm là phù hợp nhất để nhân nhanh cả theo hướng tạo đa chồi cũng như tạo nhiều đốt.



Hình 2. Cụm chồi Lan Kim Tuyến sau 6 tuần nhân nhanh trên môi trường Knud*.



Hình 3. Bình chồi Lan kim tuyến trên môi trường nhân nhanh chồi Knud*.

Lời cảm ơn

Các tác giả xin trân trọng cảm ơn Bộ Nông nghiệp & Phát triển Nông thôn, Trường Đại học Lâm nghiệp đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

- [1] L.V. Averyanov., *The Orchids of Vietnam Illustrated Survey*, Part 1 Subfamilies *Apostasioideae* and *Spiranthoideae*, Turczaninowia, 11(1) : 95-97, 2008.
- [2] Nguyễn Tiến Bản (chủ biên), *Danh lục các loài thực vật Việt Nam*, Tập 3, Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội, 2005.
- [3] Bộ Khoa học và Công nghệ, *Sách Đỏ Việt Nam (phân thực vật)*, Nxb. Khoa học Tự nhiên & Công nghệ, Hà Nội, 2007.
- [4] Chính Phủ Nước Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam, *Nghị định số 32/2006/NĐ-CP*, 2006.
- [5] Nguyễn Thị Hồng Gấm, *Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống Lan Ngọc Điểm Tai Trâu (Rhynchostylis gigantea) bằng phương pháp nuôi cấy trong ống nghiệm*, Báo cáo khoa học Trường Đại học Lâm nghiệp, 2007.
- [6] Phạm Hoàng Hộ, *Cây cỏ Việt Nam*, Quyển 3, Nxb. Trẻ, Tp. Hồ Chí Minh, 2000.
- [7] Phùng Văn Phê và nnk, *Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống In vitro loài Lan kim tuyến Anoectochilus setaceus Blume*, Báo cáo khoa học Trường Đại học Lâm nghiệp, 2009.
- [8] Nguyễn Đức Thành, *Nuôi cấy mô - tế bào thực vật - Nghiên cứu ứng dụng*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội, 2000.
- [9] Bùi Thị Tường Thu và nnk, *Nghiên cứu ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến quá trình nuôi cấy phát sinh tế bào soma và phôi vô tính ở cây hoa Dendrobium, Phalaenopsis, Cymbidium*, Báo cáo hội nghị khoa học toàn quốc lần thứ IV: Hóa sinh và sinh học phân tử phục vụ Nông, Sinh, Y học và Công nghiệp thực phẩm, 881-884, 2008.
- [10] Nguyễn Thanh Tùng, *Nhanh nhanh in vitro cây Mỹ Dung dạ lan (Vanda denisoniana Benson)*, Báo cáo Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc, 452-455, 2009.
- [11] Van Ket Nguyen, *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, 2003.

Study on Multiplication of bud in vitro of Jewel Orchid *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.

Phung Van Phe¹, Nguyen Thi Hong Gam¹, Nguyen Trung Thanh²

¹Faculty of Silviculture, Vietnam Forestry University, Xuan Mai, Chuong My, Hanoi

²Faculty of Biology, Hanoi University of Science, VNU, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam

The article presents results of research on in vitro rapid multiplication of protocorms and shoots of Jewel Orchid species *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. Knud* medium is the most suitable for in vitro rapid multiplication of protocorms and shoots of Jewel Orchid species. The 8 weeks protocorms and shoots from protocorms with 2-3 cm in length are the most suitable for in vitro rapid multiplication in the most suitable culture medium Knud* that supplemented with 0,5 mg/l BAP + 0,3 mg/l Kinetin + 0,3 mg/l NAA + 100 ml/l ND + 100 g/l potato extract + 20 g/l sucrose + 7 g/l agar + 0,5 g/l AC.

Keywords: Jewel Orchid, Protocorm, in vitro, Rapid Multiplication, Shoot.