

NGHIÊN CỨU NHÂN NHANH *IN VITRO* LOÀI LAN KIM TUYẾN (*Anoectochilus setaceus* Blume) THÔNG QUA CẢM ỨNG TẠO PROTOCORM LIKE BODIES

Trần Thị Hồng Thúy², Đỗ Thị Gấm³, Nguyễn Khắc Hưng¹,
Phạm Bích Ngọc¹, Chu Hoàng Hà^{1*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *chuhoangha@ibt.ac.vn

²Trường Đại học Sư Phạm Hà Nội 2

³Trung tâm phát triển Công nghệ cao

TÓM TẮT: Lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) là dược liệu quý được sử dụng trong các bài thuốc cổ truyền của cộng đồng các dân tộc thiểu số ở Việt Nam. Các loài lan kim tuyến phân bố rộng nhưng số lượng cá thể ngoài tự nhiên không nhiều do khả năng tái sinh chậm, đòi hỏi điều kiện sống ngặt nghèo, ngoài ra, lan kim tuyến đang bị khai thác quá mức do có nhiều dược tính quý. Nghiên cứu được tiến hành nhằm xây dựng quy trình nhân *in vitro* loài lan kim tuyến thông qua protocorm-like bodies (PLBs) với mục đích góp phần bảo tồn loài lan quý hiếm. Tỷ lệ cảm ứng tạo PLBs đạt 86,25% với nguồn mẫu là lát cắt ngang thể chồi. Khối lượng tươi trung bình của cụm PLBs sau 30 ngày nuôi cấy đạt 0,23 gam. Các cụm PLBs được nuôi cấy trên môi trường phát sinh và sinh trưởng chồi trong 30 ngày. Các chồi hình thành được tách riêng và chuyển sang giai đoạn tạo rễ. Quá trình tạo rễ bao gồm 2 giai đoạn, mỗi giai đoạn kéo dài trong 30 ngày. Sau 60 ngày, 100% chồi tạo rễ với trung bình 3,20±0,67 rễ/chồi, chiều cao cây trung bình đạt 4,57±0,85 cm với 4,21±0,42 lá/cây. Hệ số nhân chồi của toàn bộ quy trình đạt 29,66±4,04 chồi/cụm PLBs.

Từ khóa: *Anoectochilus setaceus*, hệ số nhân chồi, protocorm-like bodies (PLBs), tạo chồi từ PLBs, *in vitro*.

MỞ ĐẦU

Lan kim tuyến, *Anoectochilus setaceus* Blume, thuộc họ Phong lan (Orchidaceae), được biết đến nhiều do khả năng ứng dụng trong y dược. Theo y học cổ truyền Trung Hoa, lan kim tuyến được dùng để điều trị bệnh tiểu đường, làm tan khối u, giảm lipase trong máu và chữa viêm gan [5].

Lan kim tuyến là nguồn dược thảo quý, có giá kinh tế cao. Nhưng do số lượng ít, mọc rải rác và bị khai thác quá mức (với hình thức khai thác tận diệt) nên cây lan kim tuyến trong tự nhiên có nguy cơ bị tuyệt chủng nếu không có biện pháp bảo tồn hiệu quả. Hiện nay, lan kim tuyến được đưa vào danh mục các loài đang nguy cấp thuộc nhóm IA của Nghị định 32/2006/CP, nghiêm cấm khai thác vì mục đích thương mại và được xếp vào nhóm thực vật rừng đang nguy cấp (EN A1 a,c,d) trong Sách Đỏ Việt Nam 2007 [1]. Hiện tại, ở Việt Nam đã thống kê được 12 loài lan kim tuyến, trong đó loài *Anoectochilus setaceus* Blume thường gặp nhất và có giá trị thương mại cao nhất, gấp hàng chục lần các loài khác [7].

Hiện nay, các loài lan kim tuyến không chỉ được nghiên cứu về hoạt tính sinh học mà còn về các phương pháp nuôi cấy *in vitro*. Nguyễn Quang Thạch và Phí Thị Cẩm Miện (2012) [11] đã thiết lập quy trình nhân nhanh *in vitro* hoàn chỉnh loài lan kim tuyến *Anoectochilus setaceus* với nguyên liệu là chồi và mất đốt ngang thân với hệ số nhân chồi là 6,55 chồi/mẫu, tỷ lệ ra rễ *in vitro* đạt 100% với trung bình 4,21 rễ/chồi. Ket et al. (2004) [4] đưa ra quy trình nhân nhanh lan kim tuyến loài *Anoectochilus formosanus* bằng phương pháp tạo đa chồi với nguồn mẫu ban đầu là chồi đỉnh, hệ số nhân chồi đạt 11,1 chồi/mẫu và 100% mẫu chồi ra rễ trên môi trường có bổ sung 0,5 g/L than hoạt tính. Yih jun shiau et al. (2002) [12] nghiên cứu bảo tồn loài lan kim tuyến *Anoectochilus formosanus* bằng phương pháp nuôi cấy hạt lai nhân tạo bằng phương pháp *in vitro*. Hạt 7 ngày tuổi được khử trùng sau đó nuôi cấy trong điều kiện *in vitro*, tỷ lệ hạt sống sót, nảy mầm lên đến 77,9% và đến 90% cây sống sót, tiếp tục sinh trưởng trong vườn ươm.

Ở Việt Nam, một số công trình nghiên cứu

đã thiết lập được quy trình nhân lan kim tuyến bằng chồi và đốt thân [4, 8, 10], tuy nhiên, việc nhân nhanh lan kim tuyến thông qua cảm ứng tạo PLBs chưa được quan tâm và nghiên cứu nhiều. Chính vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này với mục đích thiết lập quy trình nhân nhanh lan kim tuyến *Anoectochilus setaceus* thông qua cảm ứng tạo PLBs nhằm gia tăng hệ số nhân chồi.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thực vật: thể chồi *in vitro* 30 ngày tuổi của cây lan kim tuyến, *Anoectochilus setaceus* Blume, do Phòng Công nghệ tế bào thực vật-Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

Môi trường nuôi cấy: môi trường cơ bản Knudson C bao gồm các muối đa lượng, vi lượng theo Knudson (1946) và vitamin B5 theo Gamborg (1968), bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng như kinetin, 2,4-D, GA₃, α-NAA tùy theo từng giai đoạn nuôi cấy.

Thể chồi *in vitro* lan kim tuyến 30 ngày tuổi (hình 2a) được khử đỉnh sinh trưởng (hình 2b) và chuyển vào 7 công thức môi trường cảm ứng tạo protocom có bổ sung 2,4-D và kinetin ở nồng độ khác nhau. Giai đoạn cảm ứng tạo PLBs được nuôi cấy trong điều kiện lỏng-lắc, 16h chiếu sáng, nhiệt độ phòng nuôi cấy 22°C. Các cụm PLBs tốt (tươi, chắc, màu xanh, không mọng nước, không bị biến dạng) được chuyển sang môi trường tạo chồi có sự kết hợp giữa BAP, kinetin, và GA₃, α-NAA và tiếp tục nuôi cấy trong 30 ngày. Sau đó, các chồi phát triển tốt, chiều cao chồi đạt từ 2-3 cm được tách riêng và chuyển lên môi trường kích thích ra rễ. Cây *in vitro* hoàn thiện được đưa ra trồng thử nghiệm trong vườn ươm để đánh giá khả năng thích nghi của chồi trong điều kiện tự nhiên.

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu thống kê phân tích theo phương pháp phân tích phương sai ANOVA bằng phần mềm SPSS.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của kinetin và 2,4 D tới khả năng hình thành PLBs từ thể chồi

PLBs đóng vai trò quan trọng trong quá

trình nhân giống *in vitro* ở các loài lan nói chung. Các nghiên cứu trước đây cho thấy, bản chất của PLBs là các thể phôi soma [11]. Một số con đường phát sinh PLBs như (1) phát sinh PLBs trực tiếp từ các tế bào tiền phôi [2, 3] và (2) phát sinh PLBs thông qua tạo mô sẹo: mẫu thực vật được cảm ứng tạo mô sẹo trên các môi trường chứa auxin như 2,4-D, picloram... sau đó, mô sẹo được chuyển sang nuôi cấy trên môi trường có hàm lượng auxin thấp để cảm ứng tạo PLBs [6, 8, 13]

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng bảy loại môi trường, ký hiệu Pr0-Pr6 (với nền môi trường chung là Knudson bổ sung 10% nước dừa và 10 g/L đường saccharoza) có bổ sung 2,4 D và kinetin ở các nồng độ khác nhau, pH=5,5 nhằm lựa chọn môi trường phù hợp cho quá trình tạo PLBs từ thể chồi lan kim tuyến. Chúng tôi nhận thấy, các mẫu thể chồi cảm ứng tạo PLBs tốt khi nuôi cấy trong điều kiện lỏng, lắc.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, môi trường Pr0 (không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng), sau 30 ngày nuôi mỗi mẫu hình thành 1-2 chồi, không hình thành PLBs (bảng 1).

Trong môi trường nuôi cấy bổ sung đồng thời 2 loại chất điều hòa sinh trưởng Pr1, Pr2, Pr3 (0,5 mg/L 2,4-D và kinetin ở các nồng độ khác nhau 1,5; 1,0 và 0,5 mg/L) sau 7 ngày nuôi cấy bắt đầu cảm ứng hình thành PLBs. Tỷ lệ tạo thành PLBs cao nhất ở môi trường Pr3 (84,25%). Sau 30 ngày nuôi cấy, trên cả 3 môi trường bổ sung chất điều hòa sinh trưởng đều thu được các cụm PLBs có khối lượng tương đương nhau: 0,151; 0,153 và 0,160 gam, các cụm PLBs có màu trắng sáng và phồng to. Tuy nhiên, khi chúng tôi cấy chuyển cụm PLBs thu được ở trên vào môi trường kéo dài chồi thì nhận thấy không có sự hình thành chồi. Như vậy, sự kết hợp giữa 2,4 D (0,5 mg/L) và kinetin (0,5; 1,0 và 1,5 mg/L) tuy tạo ra các cụm PLBs nhưng lại không kéo dài được chồi từ cụm PLBs.

Trong khi đó, ở các môi trường bổ sung kinetin đơn lẻ với các nồng độ khác nhau (0,5; 1,0; 1,5 mg/L), sự hình thành PLBs cũng như chất lượng PLBs có sự khác biệt rõ rệt. Môi trường Pr6 có sự hình thành PLBs sớm hơn (sau

10 ngày) so với môi trường Pr4 và Pr5 (sau 12 ngày), nhưng lại có tỷ lệ hình thành PLBs thấp nhất. Môi trường Pr4 (bổ sung 0,5 mg/L kinetin) có tỷ lệ hình thành PLBs cao nhất, các cụm PLBs có khối lượng lớn nhất và chất lượng tốt nhất, thể hiện ở: PLBs khỏe, màu trắng xanh,

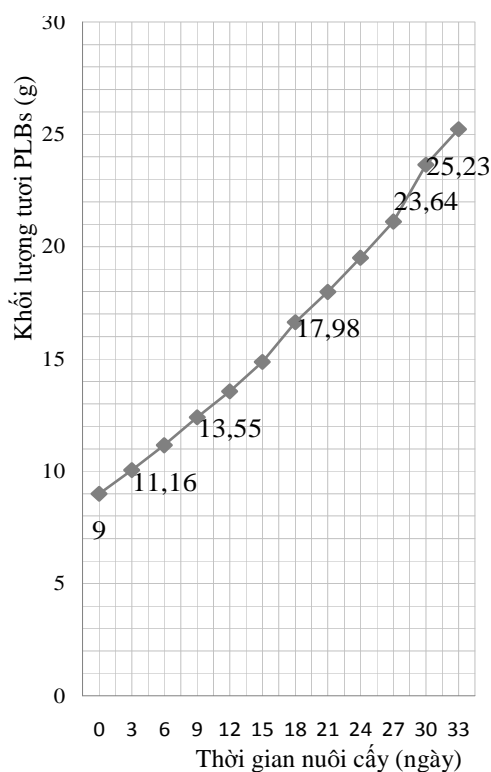
hiều thể chồi (hình 2c). Như vậy, việc bổ sung cytokinin đơn lẻ (kinetin: 0,5 mg/L) trong môi trường nuôi cấy có khả năng cảm ứng tốt nhất tạo PLBs trực tiếp từ đỉnh chồi Lan kim tuyến *Anoectochilus setaceus*.

Bảng 1. Tỷ lệ tạo thành PLBs và chất lượng PLBs trên các môi trường nghiên cứu

Công thức	Chất kích thích sinh trưởng (mg/L)		Tỷ lệ (%) hình thành PLBs	Khối lượng tươi của cụm PLBs (g) (sau 30 ngày)
Pr0	0,0	0,0	0,00	0
Pr1	0,5	1,5	73,20 ^c	0,151 ^{*a}
Pr2	0,5	1,0	77,11 ^{bc}	0,153 ^a
Pr3	0,5	0,5	84,25 ^b	0,160 ^{ab}
Pr4	0,0	0,5	86,25 ^b	0,23 ^c
Pr5	0,0	1,0	83,20 ^b	0,18 ^b
Pr6	0,0	1,5	48,34 ^a	0,21 ^c

(*). Kết quả trung bình của 3 lần lặp lại; các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

Khả năng sinh trưởng của PLBs trong môi trường Pr4



Hình 1. Tốc độ sinh trưởng PLBs trên môi trường Pr4 trong 33 ngày

Quá trình nuôi lỏng cảm ứng tạo PLBs chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như chế độ nuôi, thời gian nuôi. Với chế độ nuôi lác cố định, thời gian nuôi cấy hay thời gian thu mẫu PLBs để tiến hành tái sinh cây hoàn chỉnh có ảnh hưởng lớn đến chất lượng của cây con. Chúng tôi tiến hành theo dõi quá trình sinh trưởng của các cụm PLBs nuôi cấy trên môi trường Pr4 trong thời gian 33 ngày (hình 1). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần gồm 3 bình nuôi cấy với 9,0 g mẫu thể chồi đã khử đỉnh sinh trưởng.

Kết quả cho thấy, sự gia tăng khối lượng tập trung mạnh nhất ở giai đoạn 27-30 ngày sau nuôi cấy, khối lượng PLBs tăng gấp đôi so với giai đoạn 9 ngày tuổi và khối lượng tươi tăng xấp xỉ 2,62 lần so với khối lượng mẫu cấy. Hình 1 cho thấy, số PLBs tạo thành và phát triển khá đồng đều, ổn định qua các giai đoạn nuôi cấy. Bắt đầu từ ngày thứ 21 đến ngày thứ 30, PLBs bước vào thời kỳ tăng sinh nhanh, mạnh. Sau nuôi cấy 29-30 ngày, một số PLBs bắt đầu biệt hóa thành chồi nhỏ.

Sau 30 ngày nuôi cấy khối lượng tươi các cụm PLBs thu được là 23,64 gam, cụm PLBs chắc khỏe, có màu trắng xanh (hình 2c). Giai đoạn từ ngày 30-33 ngày PLBs vẫn tăng sinh tuy tốc độ tăng có chậm hơn giai đoạn 27-30 ngày, có hiện tượng thủy tinh thể ở một số

PLBs. Khi chuyển cụm PLBs này vào môi trường tạo chồi, những PLBs bị thủy tinh thể không kéo dài thành chồi. Chúng tôi đã chuyển PLBs nuôi cấy 25-33 ngày vào môi trường tạo chồi. Kết quả chuyển PLBs 29-30 ngày sau nuôi cấy thời gian kéo dài chồi ngắn nhất (30 ngày), tỷ lệ tạo chồi 100%, chất lượng chồi tốt nhất. Vì vậy, chúng tôi chọn thời gian nuôi cấy tạo PLBs là 30 ngày.

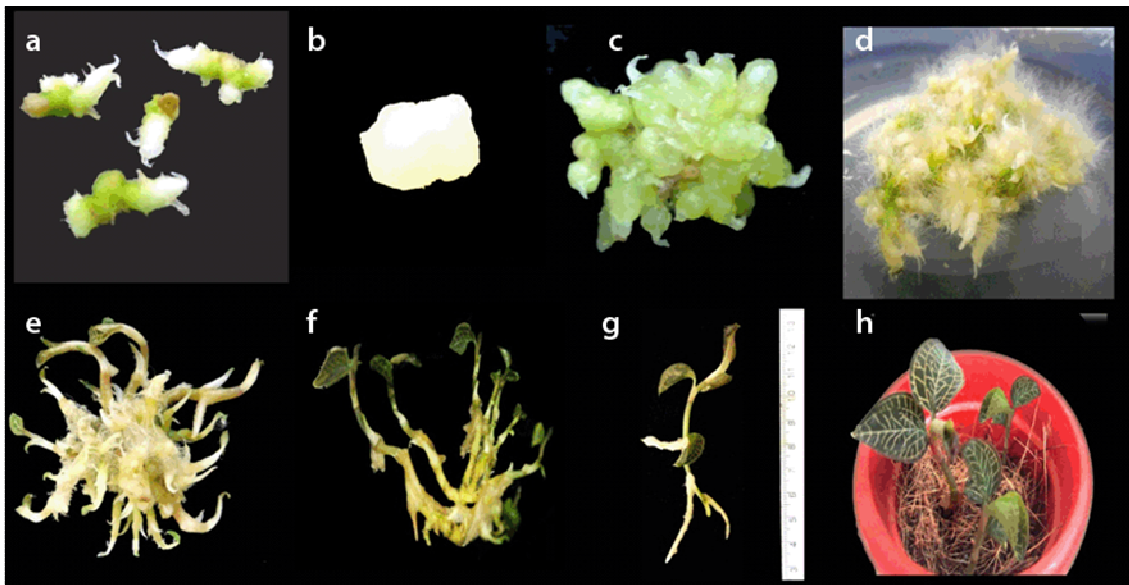
Tái sinh cây hoàn chỉnh từ PLBs

Các cụm PLBs 30 ngày tuổi tạo ra từ môi trường Pr4, có khối lượng trung bình 0,23 gam được chuyển vào nuôi cấy trên các môi trường K0 (knudson C + 10% nước dừa + 10% dịch chiết khoai tây + 30 g/L saccarosa + 2,7 g/L gelrite), K1 (K0 + 0,5 mg/L BAP + 0,3 mg/l GA₃ + 0,3 mg/L kinetin + 0,1 mg/L NAA [8, 9] và K2 (K0 + 0,5 mg/L NAA). Các môi trường K0, K1, K2 đều có pH=5,5, nhằm đánh giá khả năng phát sinh, sinh trưởng và tạo cây hoàn chỉnh từ PLBs lan kim tuyến.

Chúng tôi tiến hành tái sinh cây lan kim

tuyến từ PLBs theo hai giai đoạn. (1) Giai đoạn tái sinh chồi từ PLBs và (2) Giai đoạn sinh trưởng chồi và tạo rễ.

Ở giai đoạn (1), các cụm PLBs được chuyển lên môi trường K0 hoặc K1 để tái sinh chồi từ cụm PLBs. Sau 7-10 ngày nuôi cấy chúng tôi nhận thấy đã tạo được chồi từ PLB (hình 2d) và sau 30 ngày nuôi cấy các cụm PLBs hình thành các chồi cao 0,5-2,5 cm, có từ 1-2 lá, chồi có màu trắng-xanh (hình 2e). Kết quả sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường K0 có hệ số nhân chồi cao hơn nuôi trong môi trường K1 (22±3,76 chồi/cụm PLBs so với 20,14±4,14 chồi/cụm PLBs). Tuy nhiên, sự sai khác về hệ số nhân chồi giữa K0 và K1 không có ý nghĩa về mặt thống kê nên chúng tôi chưa chọn môi trường thích hợp cho giai đoạn tái sinh chồi từ PLBs. Kết thúc giai đoạn 1, với thời gian nuôi cấy tái sinh chồi 30 ngày, nhiều chồi vẫn nhỏ, có thể chưa kéo dài hết chồi ở cụm PLBs, nhưng nếu tiếp tục nuôi trong môi trường tạo chồi thì ảnh hưởng đến chất lượng cây con nên chúng tôi chọn thời gian nuôi cấy giai đoạn (1) là 30 ngày.



Hình 2. Tái sinh cây lan kim tuyến thông qua PLBs

a: Thể chồi nguyên liệu; b: Thể chồi khử định; c: PLBs 30 ngày sau nuôi cấy trong môi trường Pr4; d-e: Thể chồi tái sinh từ PLBs sau 10, 30 ngày nuôi cấy trên môi trường K1 (giai đoạn 1); f-g: Chồi lan kim tuyến sau 60, 90 ngày nuôi cấy trên môi trường K0 (giai đoạn 2); h: cây lan kim tuyến trồng thủy canh trên giá thể xơ dừa.

Bảng 2. Khả năng tạo cây hoàn chỉnh và hệ số nhân chồi của toàn qui trình nuôi cấy

Công thức (1)-(2)	Tỷ lệ tạo rễ (%)	Số rễ TB tạo thành	Hiệu suất nhân chồi (số chồi/cụm PLBs)	Đặc điểm cây con	
				Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây
K0-K0	100	3,07 ^c	22,50 ^a	4,30 ^{ab}	4,42 ^b
K0-K2	100	3,92 ^a	23,00 ^{ab}	4,53 ^a	4,50 ^b
K1-K0	100	3,20 ^c	29,66 ^b	4,57 ^a	4,21 ^b
K1-K2	97,34	2,25 ^b	38,33 ^a	3,64 ^b	3,31 ^a

(*). Kết quả trung bình của 3 lần lặp lại; các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.

Trong giai đoạn (2), chúng tôi tách cụm chồi (3-4 chồi) từ cụm chồi đã tái sinh từ một cụm PLBs thu được ở giai đoạn (1) chuyển sang môi trường K0 hoặc K2 để chồi tiếp tục sinh trưởng. Sau 30 ngày nuôi cấy đầu tiên, chúng tôi tiến hành tách riêng từng chồi và chuyển sang cùng môi trường để chồi sinh trưởng và ra rễ.

Trong quá trình tiến hành thí nghiệm, chúng tôi nhận thấy, môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng K0 cũng có khả năng cảm ứng tạo rễ ở các chồi lan kim tuyến. Do đó, chúng tôi tiến hành nuôi cấy các chồi riêng biệt trên cả hai môi trường K0 và K2 trong giai đoạn (2). Giai đoạn (2) kéo dài trong 60 ngày. Kết quả theo dõi sau 90 ngày được thể hiện ở bảng 2.

Kết quả cho thấy, khi tách chuyển các cụm chồi nuôi cấy trong hai môi trường K0 và K1 ở giai đoạn (1) vào cùng một môi trường tạo rễ (K0 hoặc K2) ở giai đoạn (2), hệ số tạo chồi có sự sai khác lớn.

Khi chuyển các cụm chồi từ nuôi cấy trong môi trường K0 sang môi trường sinh trưởng và tạo rễ K0 không thấy có sự sai khác nhiều về hiệu quả tạo chồi. Nguyên nhân có thể do môi trường tái sinh chồi K0 (không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng) các cytokinin ngoại sinh được cây sử dụng hết trong giai đoạn (1), sau 30 ngày nuôi cấy chuyển sang môi trường sinh trưởng chồi và tạo rễ K0 hoặc K2 (không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin) trong mẫu cấy chỉ còn cytokinin nội sinh, nên ở giai đoạn này cây gần như không tạo thêm chồi công thức K0-K0 có hiệu suất nhân cây là 22,5 trong khi kết quả tương tự từ công thức K0-K2 là 23,00). Bên cạnh đó, các chồi tạo thành có chất lượng đồng đều. Điều này thể hiện ở chiều cao chồi và số lá/cây giữa 2 công

thức không có sai khác rõ rệt (bảng 2). Tuy nhiên, việc bổ sung 0,5 mg/l NAA ở môi trường K2 cho số lượng rễ/chồi (3,92 rễ/chồi) cao hơn ở môi trường K0 (3,07 rễ/chồi).

Khi chuyển các cụm chồi từ môi trường K1 ở giai đoạn (1) sang môi trường K2 hay K0 đều có hiệu suất nhân cây (số cây/cụm PLBs) cao hơn các cụm chồi được chuyển từ môi trường K0. Hiệu suất nhân cây tăng do trong 30 ngày đầu giai đoạn (2), các cụm chồi được tách từ môi trường K1 vẫn tiếp tục tạo chồi (hình 2f). Hiện tượng này có thể do khi chồi sinh trưởng trong môi trường tái sinh chồi K1 (bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin) khi chuyển sang môi trường mới ở giai đoạn (2) các cụm chồi vẫn còn dư lượng chất kích thích cytokinin nên tiếp tục hình thành chồi nách, đồng thời kéo dài hết các chồi bắt đầu hình thành từ môi trường tái sinh chồi mà chưa đếm được. Công thức K1-K2 cho hiệu suất nhân cây cao nhất 38,33 cây. Tuy nhiên, cây con tạo thành có chất lượng thấp (số rễ/cây, chiều cao cây, số lá/cây ít và không đồng đều) không đủ điều kiện đưa ra vườn ươm. Trong khi đó, công thức K1-K0 sau 60 ngày nuôi cấy cho chất lượng cây con tốt hơn và đủ tiêu chuẩn đưa ra vườn ươm với hiệu suất nhân cây đạt 29,66 cây/cụm PLBs với 100% chồi tạo rễ và trung bình tạo 3,2 rễ/ chồi, các chồi đạt chiều cao trung bình 4,57cm và có 4,21 lá/cây (hình 2g). Căn cứ vào những phân tích trên, chúng tôi chọn môi trường K1 (bổ sung 0,5 mg/L BAP + 0,3 mg/L GA3 + 0,3 mg/L kinetin + 0,1 mg/L NAA) là môi trường tái sinh chồi và môi trường K0 (không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng) là môi trường sinh trưởng và tạo rễ của chồi khi xây dựng quy trình nhân lan kim tuyến.

Nguyễn Quang Thạch và Phí Thị Cẩm Miện (2012) [10] đã thiết lập quy trình nhân nhanh *in vitro* hoàn chỉnh loài lan kim tuyến *Anoectochilus setaceus* với nguyên liệu là chồi và mắt đốt ngang thân với hệ số nhân chồi là 6,55 chồi/mẫu. Trương Thị Bích Phượng, Phan Ngọc Khoa (2013) đã nhân thành công lan kim tuyến qua nuôi cấy cụm protocorm ($2,0 \times 2,0$ mm) được hình thành từ hạt cho hệ số nhân là 5,62 chồi/cụm protocorm với tổng thời gian nuôi cấy là 32 tuần [8]. Như vậy, chúng tôi bước đầu đã tạo được quy trình nhân nhanh lan kim tuyến *Anoectochilus setaceus* thông qua cảm ứng tạo PLBs với hiệu suất nhân cây cao 29,66 chồi/cụm PLBs

Đánh giá khả năng thích nghi của chồi lan kim tuyến *in vitro* ngoài vườn ươm

Đánh giá khả năng sống của cây lan kim tuyến khi chuyển ra giá thể trồng là khâu quan trọng để đánh giá hiệu quả của quy trình nhân giống *in vitro*. Chính vì vậy chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm chuyển 100 cây lan kim tuyến nuôi cấy *in vitro* ra trồng trong vườn ươm (có mái che). Trồng bằng phương pháp thủy canh với giá thể là xơ dừa hoặc trồng trên giá thể là than củi + vỏ thông + rêu với tỷ lệ phối trộn là 3:2:1 hoặc trên giá thể rêu + than với tỷ lệ 4:1. Thời gian trồng 6 tuần. Kết quả trồng thủy canh cho thấy, tỷ lệ sống sót ngoài vườn ươm xấp xỉ 100% (hình 2h). Trong khi đó, trồng trên giá thể than củi + vỏ thông + rêu, tỷ lệ cây sống thấp hơn, khoảng 96%. Thấp nhất là cây trồng trên giá thể rêu + than, tỷ lệ cây sống chỉ khoảng 80%. Toàn bộ cây còn sống đều sinh trưởng và phát triển bình thường, cây ra rễ và lá mới. Với tỷ lệ cây trồng trong vườn ươm sống là 80%-100% tùy môi trường ươm, toàn bộ cây còn sống đều ra rễ và lá mới đã chứng minh cây lan kim tuyến nuôi cấy *in vitro* thông qua tái sinh PLBs có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt trong điều kiện vườn ươm.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã nghiên cứu hoàn thiện quy trình tái sinh cây lan kim tuyến, *Anoectochilus setaceus* Blume, thông qua PLBs như sau:

Chuẩn bị vật liệu *in vitro* để cảm ứng tạo PLBs: nuôi đốt thân lan kim tuyến trong môi

trường pr4, 30 ngày để thu chồi.

Cảm ứng tạo PLBs: môi trường thích hợp nhất để cảm ứng tạo PLBs là Pr4 (Knudson cơ bản + 0,5 mg/L kinetin + 10 g/L đường saccarosa + 10% nước dừa, pH=5,5). Cắt chồi, bỏ đỉnh chồi, nuôi trong môi trường pr4 sau 30 ngày thì thu PLBs. Tỷ lệ tạo PLBs là 86,25%, khối lượng trung bình của cụm PLBs sau 30 ngày nuôi cấy là 0,23 gam/cụm PLBs, PLBs thu được có chất lượng tốt.

Tái sinh cây hoàn chỉnh từ PLBs: tái sinh cây lan kim tuyến từ PLBs theo hai giai đoạn. (1) Giai đoạn tái sinh chồi từ PLBs. (2) Giai đoạn sinh trưởng chồi và tạo rễ.

(1) Giai đoạn tái sinh chồi từ PLBs: chồi được tái sinh trên môi trường Knudson C bổ sung 10% nước dừa, 10% dịch chiết khoai tây, 30 g/L đường saccarosa, 0,5 mg/L BAP, 0,3 mg/l GA₃, 0,3 mg/L kinetin, 0,1 mg/L NAA và 2,7 g/L gelrite, pH=5,5.

(2) Giai đoạn sinh trưởng chồi và tạo rễ: Các chồi sinh trưởng và tạo rễ hình thành cây hoàn chỉnh trên môi trường Knudson C cơ bản bổ sung 10% nước dừa, 10% dịch chiết khoai tây, 2,7 g/L gelrite và 30 g/L đường saccarosa, pH=5,5.

Bước đầu cho thấy, phương pháp trồng thủy canh trên giá thể xơ dừa phù hợp cho giai đoạn tập huấn cây trong vườn ươm. Cây lan kim tuyến sinh trưởng ổn định, phát triển tốt, ra rễ và lá mới cho tỷ lệ sống sót cao. Bằng phương thức phát triển cây thông qua giai đoạn cảm ứng tạo PLBs trong một thời gian ngắn (120 ngày) có thể nhân nhanh loài Lan kim tuyến, *Anoectochilus setaceus*, với hiệu suất nhân cao (29,66 chồi/cụm PLBs 0,23 gam). Cây giống thu được từ quy trình có tỷ lệ sống cao (80%-100%), cây con sinh trưởng bình thường khi chuyển ra vườn ươm.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện trong khuôn khổ đề tài cấp nhà nước “Nghiên cứu phát triển công nghệ chiếu sáng LED phục vụ nông nghiệp Tây Nguyên” thuộc chương trình Tây Nguyên 3 “Khoa học và công nghệ phục vụ phát triển kinh tế-xã hội vùng Tây Nguyên”-TN3/C09. Các thí nghiệm được tiến hành có sự dụng trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2007. Sách Đỏ Việt Nam. Phần II. Thực Vật. Nxb. Khoa học tự nhiên và Công nghệ, 611 trang.
2. Chong- Siang Tee, Ching- Qing Wong, Xui-Lai Lam, Mahmood Maziah, 2010. A preliminary study of protocorm- like- bodies (PLBs) induction using leaf explants of *Vanda* and *Dendrobium* orchids. *AsPac J. Mol. Biol. Biotechn.*, 18(1): 189-191.
3. Juliana Lischka Sampaio Mayer, Giulio Cesare Stancato, Beatriz Appezzato-Da-Glória, 2010. Direct regeneration of protocorm-like bodies (PLBs) from leaf apices of *Oncidium flexuosum* Sims (Orchidaceae). *Plant Cell Tiss Organ Cult.*
4. Nguyen Van Ket, Hahn E. J., Park S.Y., Chakrabarty D., Paek K. Y., 2004. Micropropagation of an endangered orchid *Anoectochilus formosanus*. *Biologia Plantarum*, 48(3): 339-344.
5. Đỗ Tất Lợi, 2004. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nxb. Y học. Hà Nội, 1294 trang.
6. Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Thụy Minh Hạnh, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Văn Bình, Vũ Quốc Luận, 2008. Các con đường phát triển của phôi vô tính thực vật. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 6(4): 397-414.
7. Phùng Văn Phê, Nguyễn Trung Thành, Vương Duy Hưng, 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 ĐHQGHN, Khoa học tự nhiên và Công nghệ*, 26: 104-109.
8. Trương Thị Bích Phượng, Phan Ngọc Khoa, 2013. Nhân giống in vitro cây Lan Kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế*, 79(1).
9. Nguyen Trung Thanh, Pham Luong Hang, Nguyen Van Ket, Truong Thi Lan Anh, Phung Van Phe, Nguyen Thi Hong Gam, Phi Thi Cam Mien, 2012. The role of different medium and plant hormones on multiple shoots of Jewel orchids (*Anoectochilus setaceus* Blume). *VNU Journal of Science, Natural Sciences and Technology*, 28: 47-53.
10. Nguyễn Quang Thạch, Phí Thị Cẩm Miện, 2012. Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống loài lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) in vitro bảo tồn nguồn dược liệu quý. *J. Sci. Devel.*, 10 (4): 597-603.
11. Vũ Văn Vụ, Nguyễn Mộng Hùng, Lê Hồng Điệp, 2010. Công nghệ sinh học. Nxb. Giáo dục, Hà Nội, 184 trang.
12. Yih-Juh Shiau, Abhay P. Sagare, Uei-Chin Chen, Shu-Ru Yang, and Hsin-Sheng Tsay, 2002. Conservation of *Anoectochilus formosanus* Hayata by artificial cross-pollination and in vitro culture of seeds. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 43: 123-130.
13. Yung I Lee, Shan-Te Hsu, Edward C. Yeung, 2013. Orchid Protocorm Like Bodies are Somatic embryos. *American Journal of Botany*, 100(11): 1-11.

**IN VITRO MICROPROPAGATION OF AN ENDANGERED
MEDICINAL ORCHID (*Anoectochilus setaceus* Blume)
THROUGH PROTOCORM-LIKE BODIES**

**Tran Thi Hong Thuy², Do Thi Gam³, Nguyen Khac Hung¹,
Pham Bich Ngoc¹, Chu Hoang Ha¹**

¹Institute of Biotechnology, VAST

²Hanoi Pedagogical No 2

³Center for High Technology Development

SUMMARY

Anoectochilus setaceus Blume is one of the rare medicinal orchids in Vietnam. *Anoectochilus setaceus* has various functions in traditional medicine, such as anti-tumor, lipase decreasing, anti-diabetes, anti-hepatitis... Nowadays, lan kim tuyen individuals in the nature is limited because of its slowly growth, special condition requirements and especially, been excessively exploited, that can result in the extinction. In order to preserve plant biodiversity, develop and expand lan kim tuyen cultivation, a rapid micropropagation protocol through PLBs-protocorm like bodies is established. Detached apical shoots were used as explants for PLBs initiation. After 30 days-culture, 86.25% of the explants regenerated to PLBs with fresh weight approximately 0.23 gram per clump. Shoots were quickly regenerated from the derived PLBs by transplanting onto shoot regenerating medium in next 30 days. Single intact shoot separated from shoot clump was transferred to elongating and rooting formation medium. After 120 days of culturing process, micropropagation productivity achieves about 29.66 plantlets per PLBs.

Keywords: *Anoectochilus setaceus*, micropropagation, PLBs, protocorm-like bodies.

Ngày nhận bài: 18-12-2014